

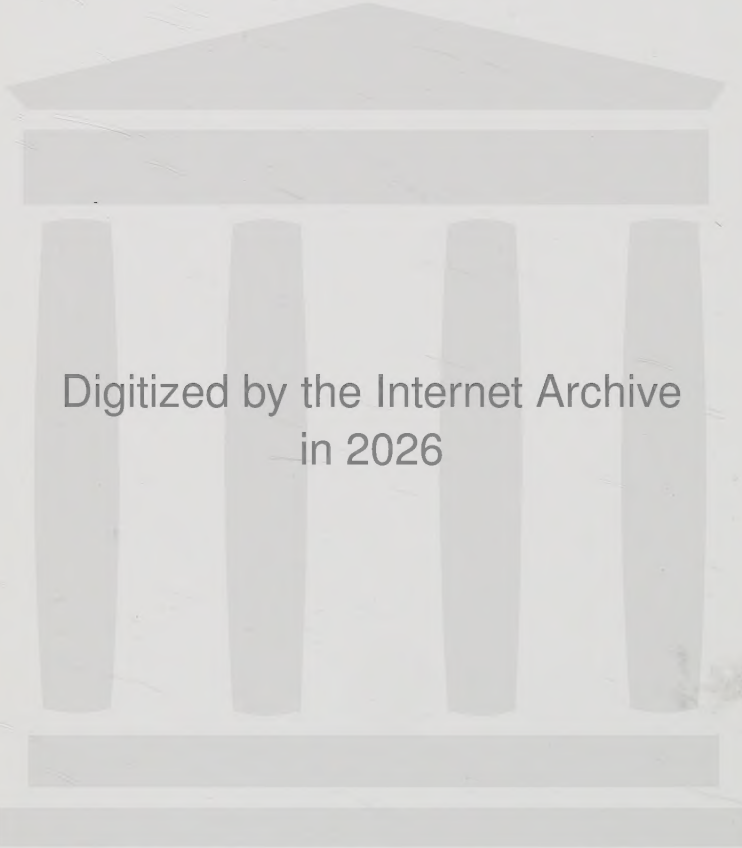
Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. G.W. Korting

**Untersuchungen zum Verhalten des
"Collagen-like Protein"
im Serum**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Rolf-Achim Schlaudecker
aus Bad Ems

Mainz 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554814_0060

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. G.W. Korting

**Untersuchungen zum Verhalten des
"Collagen-like Protein"
im Serum**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Rolf-Achim Schlaudecker
aus Bad Ems

Mainz 1967



Dekan: Professor Dr. Dr. Thews

Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Holzmann

Korreferent: Professor Dr. G.W. Korting

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
 - a. Hydroxyprolin und Kollagenstoffwechsel
 - b. "Collagen-like Protein"
- II. Problemstellung
- III. Experimenteller Teil
 - a. Tierversuche
 - b. Gewinnung und Aufbewahrung des Rattenserums
 - c. Kontrollpersonen und Sklerodermiepatienten
 - d. Hydroxyprolinbestimmung
 - 1. Prinzip der Methode
 - 2. Reagenzien
 - 3. Präparation des Ionenaustauschers
 - 4. Vorversuche
 - 5. Ausführung der Bestimmungen
 - aa) Eichkurve
 - bb) Bestimmungsansatz
- IV. Statistische Verfahren
 - a. Korrelationsrechnung
 - b. 1. Einfache Varianzanalyse
 - 2. Kovarianzanalyse und Tuckey-Test
 - c. Wilcoxon-Test
- V. Ergebnisse
 - a. Tierversuche
 - b. Kontrollpersonen
 - c. Sklerodermiepatienten
- VI. Diskussion

VII. Zusammenfassung

VIII. Tabellen

IX. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

a. Hydroxyprolin und Kollagenstoffwechsel

Die Bestimmung des Hydroxyprolins (Hypro), das auf Grund seines praktisch ausschließlichen, hohen und konstanten Vorkommens im Kollagen (WOESSNER, 1961; DULL u. HENNEMAN, 1963; BUDDECKE u. RUFF-LICHTENSTEIN, 1963) als "Leitfossil" dieses Faserproteins aufzufassen ist, kann in verschiedenen biologischen Substraten erfolgen. So erlauben die Hydroxyprolinausscheidung im Urin (Hypro-A) sowie sein Gehalt im Plasma bzw. Serum weitgehende Rückschlüsse auf den Stoffwechsel des Kollagens bzw. seinen physiologischen und pathologischen Umbau und Abbau, während die Bestimmung im Gewebe eine quantitative Aussage über den Kollagengehalt und die mengenmäßige Verteilung der einzelnen Fraktionen zuläßt.

Im Urin wird Hypro zu 97-99 % in peptidgebundener Form und zu 1-3 % als freie Iminosäure^{*)} ausgeschieden (ZIFF, KIBRICK, DRESNER u. GRIBETZ, 1956; PROCKOP u.

^{*)} Da das im Urin ausgeschiedene freie Hypro praktisch wegen seines nur sehr geringen Anteils am insgesamt ausgeschiedenen Hypro zu vernachlässigen ist - Ausnahme ist die Hydroxyprolinaemie, eine Stoffwechselstörung (s. hierzu EFRON, BIXBY, PALATTAO u. PRYLES, 1962 u. 1965) -, ihm somit keine diagnostische Bedeutung zukommt, wird allgemein das peptidgebundene Hypro dem Gesamt-Hypro gleichgesetzt.

SJOERDSMA, 1961; KIBRICK, HASHIRO u. SAFIER, 1962; MEILMAN, URIVETZKY u. RAPOPORT, 1963), wobei mehr als 75 % dieser Peptide in ihrer Zusammensetzung im Kollagen vorliegenden Aminosäuresequenzen entsprechen (SMILEY u. ZIFF, 1964).

Untersuchungen mit ^{14}C -Prolin haben ergeben, daß das im Urin ausgeschiedene Hypro vorwiegend der stoffwechselaktiven - Halbwertszeit 2-3 Tage - (HARKNESS, MARKO, MUIR u. NEUBERGER, 1954; GERBER, GERBER u. ALTMAN, 1960; KÜHN, DURRUTI, IWANGOFF, HAMMERSTEIN, STECHER, HOLZMANN u. KORTING, 1964), neutralsalzlöslichen Kollagenfraktion (NLK) entstammt (LINDSTEDT u. PROCKOP, 1961; PROCKOP, 1964; s. auch GRASSMANN, ENGEL, HANNIG, HÖRMANN, KÜHN u. NORDWIG, 1965). Somit besteht ein Zusammenhang zwischen der Hypro-A und dem NLK-Gehalt bzw. der Kollagensynthese über leicht abbaubare Zwischenstufen (JASIN, FINK, WISE u. ZIFF, 1962; KÜHN, DURRUTI, IWANGOFF, HAMMERSTEIN, STECHER, HOLZMANN u. KORTING, 1964).

Da mit zunehmendem Alter auf Grund einer verminderten Kollagensynthese der Gehalt an NLK abnimmt (GROSS, 1958; s. auch GRASSMANN, ENGEL, HANNIG,

HÖRMANN, KÜHN u. NORDWIG, 1965), ist auch nur mehr eine verminderte Hypro-A festzustellen, wobei das Hypro vorwiegend dem reifen, unlöslichen Kollagen mit seiner geringen Abbaurate entstammt.

Dadurch, daß sich nun 55 % des gesamten im Körper vorhandenen Kollagens in der Knochenmatrix befinden (CURTIS, 1963) und das Osteoidkollagen eine in metabolischer Hinsicht höhere Aktivität aufweist als das Kollagen des Bindegewebes (GOULD, MANNER, GOLDMAN u. STOLMAN, 1960), wird allgemein angenommen, daß durch die Messung der Hypro-A in erster Linie Vorgänge in der "Knochendynamik" erfaßt werden (ZIFF, KIBRICK, DRESNER u. GRIBETZ, 1956; PROCKOP u. SJOERDSMA, 1961; DULL u. HENNEMAN, 1963; CHARVÁT, PACOVSKÝ u. DUBOVSKÝ, 1964; LEE u. LLOYD, 1964; HOLZMANN u. KORTING, 1965).

Auch im Plasma und Serum konnte Hypro in freier und peptidgebundener Form nachgewiesen werden. Auf Grund der Tatsache, daß eine Korrelation zwischen der Hypro-A und dem freien sowie peptidgebundenen Hypro-Gehalt des Plasmas bzw. des Serums besteht, sind verschiedene Autoren der Ansicht, daß die Hypro-A wie auch der Hypro-Gehalt

des Plasmas bzw. des Serums dem gleichen Kollagenpool entstammen (PROCKOP, KEISER u. SJOERDSMA, 1962; KIVIRIKKO, KOIVUSALO, LAITINEN u. LAMBERG, 1964; LAITINEN, NIKKILÄ u. KIVIRIKKO, 1966).

b. "Collagen-like Protein"

Neuerdings haben KEISER, LeROY, UDENFRIEND und SJOERDSMA (1963) sowie LeROY, KAPLAN, UDENFRIEND und SJOERDSMA (1964) das Vorkommen eines protein-gebundenen Hydroxyprolins im Blutplasma und Serum nachgewiesen. Mittels fraktionierter Eiweißfällung und Gelfiltration wurde gezeigt, daß etwa 80 % des Proteins ein den α_2 -Makroglobulinen und den α_2 - und β -Lipoproteinen sowie 10 % ein dem Albumin entsprechendes Verhalten zeigen. Während erstere Fraktion gegenüber den proteolytischen Fermenten Pronase und Chymotrypsin resistent ist, wird letztere durch diese Proteasen abgebaut. Die Autoren vertreten auf Grund ihrer Ergebnisse die Ansicht, daß es sich hierbei um ein kollagen-ähnliches Protein (lösliche Kollagenvorstufe?) und ein Kollagenfragment bzw. ein denaturiertes Kollagen handelt und bezeichnen diese beiden

hydroxyprolinhaltigen Proteine in ihrer Gesamtheit als "Collagen-like Protein" (CLP). Auch FREY (1965) konnte mit Hilfe der Säulenelektrophorese ein CLP in der α_2 - β -Globulinfraktion feststellen. Weiterhin ergaben immunoelektrophoretische Untersuchungen mit Rattenantiserum gegen menschliches Kollagen, daß im menschlichen Serum ein kollagenähnliches Antigen vorliegt, das in der α_2 - β -Globulinfraktion lokalisiert ist. Hieraus folgern die Autoren, daß sowohl im menschlichen Plasma als auch im Serum eine lösliche Kollagenfraktion vorliegt (FREY, 1965; FREY, NGOUN HOA, GRAS, HENRY u. GUDEFIN, 1965).

II. Problemstellung

Die genauen Beziehungen des CLP zum Kollagenstoffwechsel sind bisher noch weitgehend unklar. Auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen kann eine Korrelation zwischen dem CLP einerseits und dem peptidgebundenen wie freien Hypro im Plasma bzw. Serum und der Hypro-A andererseits offenbar nicht mit Sicherheit gefolgert werden (LeROY u. SJOERDSMA, 1965). Es hat somit den Anschein, daß das CLP vielleicht einem anderen Pool entstammt und eventuell einen neuen Parameter des Kollagenstoffwechsels darstellen könnte. Durch die Bestimmung dieses CLP wären somit u. U. weitere aufschlußreiche Hinweise über den Kollagenstoffwechsel zu gewinnen.

Es soll nun die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, das Verhalten des CLP im Rattenserum in Abhängigkeit vom Alter und nach Anwendung verschiedener bindegewebswirksamer Substanzen zu untersuchen. Weiterhin war dieser Parameter bei Kontrollpersonen, ebenfalls in Abhängigkeit vom Alter und bei Kranken mit Sklerodermie, bei letzteren auch

nach Gestagentherapie, zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen sodann in Beziehung zu den schon bekannten altersbedingten Veränderungen im Kollagenstoffwechsel und zu den schon ausführlich untersuchten Wirkungsweisen der zuvor angeführten Substanzen auf den Kollagenstoffwechsel bzw. den bereits vorliegenden Befunden über das biochemische Profil der Sklerodermie gesetzt werden.

III. Experimenteller Teil

a. Tierversuche

Die Tierversuche wurden mit weiblichen Albinoratten (Sprague Dawley) eines Inzuchtstammes durchgeführt. Bei 6 unter gleichen Versuchsbedingungen laufenden Gruppen mit jeweils 15 Tieren wurde die Wirkung bindewebswirksamer Substanzen (β -Aminopropionitril^{*)}, Corticosteroid^{**}), Gestagen^{***}) und Penicillamin^{****}) auf den CLP-Gehalt im Serum untersucht, wobei eine Gruppe als Kontrolle diente. Innerhalb einer weiteren Gruppe, die 60 Tiere umfaßte, wurde die Altersabhängigkeit des Serum-CLP-Gehaltes bei unbehandelten Ratten untersucht.

Als Grundnahrung erhielten die Tiere je 10 g Hackfleisch und je 10 g Altromin^{*****}). Jeweils zu Beginn und am Ende der Versuche erfolgte die Gewichtsbe-

-
- *) β -Aminopropionitril fumarat, Serva, Entwicklungslabor Heidelberg
 - **) Ketocort-H^(R) der Firma Desitin-Werke, Karl Klinke GmbH, Hamburg
 - ***) Norethisteronacetat=Primolut^(R)-Nor und Proluton^(R) der Firma Schering AG, Berlin
 - ****) Metalcaptase^(R)-HCl der Firma Heyl & Co., Chem.-pharm. Fabrik, Berlin 37
 - *****) Altromin-Ms, Altrogge, Spezialfutterwerk, Lage/Lippe

stimmung. Die Verabfolgung der bindegewebswirksamen Substanzen, ihre Applikationsart, Anzahl sowie Anfangs- und Endgewicht der Versuchstiere und Versuchsdauer ergeben sich aus den Tabellen 1 und 2 (s. S. 10 und 11).

Gruppe	Wirkstoff	Applikationsart	Menge (mg) pro Tag gesamt		Versuchsdauer
1	BAPN	per os	40,0	640,0	16 Tage
2	Corticosteroid	per os	1./2.Tag 1,0 3./16.Tag 0,3	6,2	16 Tage
3	Norethisteronacetat	per os	0,5	8,0	16 Tage
4	Progesteron	s.c.	0,5	8,0	16 Tage
5	Penicillamin	per os	0,3	4,8	16 Tage
6	Kontrollgruppe	Ø	Ø	Ø	16 Tage
7	Altersabhängigkeit	Ø	Ø	Ø	5 Tage

Tab. 1 Dosierung und Applikationsart von β -Aminopropionitril, Corticosteroid, Gestagen und Penicillamin sowie Versuchsdauer innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

Gruppe	Zahl der Tiere	Ag (g)	Eg (g)	Gewichtszunahme (g/die)
1	15	104,34	150,40	2,87
2	15	87,44	107,43	1,25
3	15	87,07	132,80	2,85
4	15	99,14	136,87	2,23
5	15	96,94	134,43	2,34
6	15	93,20	129,54	2,27
7	60	Ø	Ø	Ø

Tab. 2 Anzahl, durchschnittliches Anfangs- (Ag) und Endgewicht (Eg) sowie durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme der Versuchstiere

b. Gewinnung und Aufbewahrung des Rattenserums

Zur Gewinnung von hämolysefreiem Serum wurden bei den mit Äther betäubten Ratten die freipräparierten Carotiden eröffnet und das frei auslaufende Blut in silikonisierten Zentrifugenröhrchen auffangen. Das Blut wurde eine Stunde in den Kühlschrank gestellt, sodann bei 2500 U/min 30 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde das Serum mit ausgezogener Pipette vorsichtig abgezogen und bis zur Bestimmung des CLP bei minus 25° C aufbewahrt. Bei Lagerung des Serums bis zu 4 Wochen konnte kein Verlust des CLP-Gehaltes festgestellt werden (s. hierzu Abb. 1).

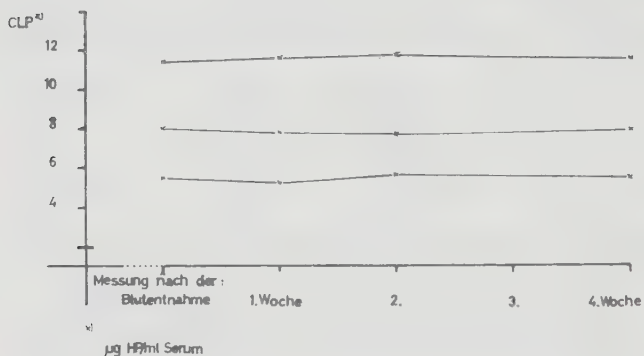


Abb. 1 Graphische Darstellung des Verhaltens von CLP bei 3 Seren nach Aufbewahrung derselben bei - 25° C

Im Gegensatz zu LeROY, KAPLAN, UDENFRIEND und SJOERDSMA (1964) wurde das CLP nicht im Plasma, sondern im Serum bestimmt. Dabei sollen die Serum-CLP-Werte im Vergleich zu den Plasma-CLP-Werten 10-15 % niedriger sein (LeROY u. SJOERDSMA, 1965).

c. Kontrollpersonen und Sklerodermiepatienten

Zu weiteren Untersuchungen über den CLP-Gehalt des Serums beim Menschen wurden insgesamt 25 Kontrollpersonen - außer 10 Neugeborenen 15 ältere Proban-

ten (20-60 Jahre) - sowie 15 Sklerodermiepatienten (11 Fälle mit progressiver und 4 Fälle mit circumscripter Sklerodermie) herangezogen (s. hierzu Tab. 3 und 4).

Das zur Untersuchung verwandte Blut wurde mit Ausnahme des Nabelschnurblutes durch Punktion der Venen in der Ellenbogenbeuge gewonnen und bis zur Bestimmung des Serum-CLP-Gehaltes bei minus 25° C aufbewahrt, nachdem es den gleichen Präparationen wie das Rattenblut unterworfen worden war (s. S. 11).

Eine bestimmte Diät mußten die Patienten nicht einhalten, da sich im Gegensatz zur Hypro-A und dem Hypro-Gehalt im Plasma bzw. Serum keine Einflüsse der Nahrung auf das CLP bemerkbar machen (LeROY u. SJOERDSMA, 1965). Bei der alimentären Zufuhr von Hydroxyprolin, z.B. in Form von Gelatine, einem thermisch gespaltenen Kollagen, kommt es zu einer erhöhten Hypro-A (ZIFF, DRESNER, KIBRICK u. GRIBETZ, 1956) und auch, wie Untersuchungen von BAUMANN, FRITZE und KALLWEIT (1964) zeigten, zu einer Hypro-Erhöhung im Serum.

Lfd. Nr.	Geschlecht	Alter
1	♀	Nabelschnurblut
2	♂	Nabelschnurblut
3	♂	Nabelschnurblut
4	♀	Nabelschnurblut
5	♂	Nabelschnurblut
6	♀	Nabelschnurblut
7	♀	Nabelschnurblut
8	♂	Nabelschnurblut
9	♂	Nabelschnurblut
10	♂	Nabelschnurblut
11	♂	25 Jahre
12	♂	42 Jahre
13	♂	24 Jahre
14	♀	40 Jahre
15	♂	23 Jahre
16	♂	40 Jahre
17	♂	34 Jahre
18	♀	32 Jahre
19	♂	55 Jahre
20	♂	25 Jahre
21	♀	47 Jahre
22	♂	27 Jahre
23	♀	54 Jahre
24	♀	37 Jahre
25	♂	46 Jahre

Tab. 3 Zahl, Geschlecht und Alter von Kontrollpersonen

Lfd.Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose
1	♀ +	71 Jahre	progr. Sklerodermie
2	♀ +	63 Jahre	progr. Sklerodermie
3	♂	47 Jahre	progr. Sklerodermie
4	♀ +	45 Jahre	progr. Sklerodermie
5	♀ +	61 Jahre	progr. Sklerodermie
6	♀ +	67 Jahre	progr. Sklerodermie
7	♀ +	54 Jahre	progr. Sklerodermie
8	♀ +	60 Jahre	progr. Sklerodermie
9	♀ +	53 Jahre	progr. Sklerodermie
10	♀ +	29 Jahre	progr. Sklerodermie
11	♀ +	14 Jahre	circ. Sklerodermie
12	♀ +	67 Jahre	circ. Sklerodermie
13	♂	46 Jahre	circ. Sklerodermie
14	♀ +	25 Jahre	circ. Sklerodermie
15	♂	34 Jahre	Scleroderma adul- torum Buschke

Tab. 4 Zahl, Geschlecht und Alter der Sklerodermie-
kranken

d. Hydroxyprolinbestimmung

Zur Erfassung des CLP-Gehaltes im Serum erschien uns die Methode von PROCKOP und UDENFRIEND (1960), modifiziert nach LARÖF, KAPLAN, UDENFRIEND und SJOERDSMA (1964), am besten geeignet, da diese speziell für die Bestimmung des CLP-Gehaltes im Serum entwickelt wurde und nach Angabe der Autoren von ihr eine sehr hohe Empfindlichkeit zu erwarten war.

1. Prinzip der Methode

Die Methode beruht auf der Äthanol-Ausfällung der Serum-eiweißkörper und somit auch des CLP, vollständiger Hydrolyse der ausgefällten Eiweißkörper in alkalischem Milieu, Trennen des aus dem CLP freigesetzten Hypro's von Begleitsubstanzen durch Kationenaustauschchromatographie und anschließender photometrischer Bestimmung des Hypro's nach PROCKOP und UDENFRIEND (1960). Die CLP-Bestimmung erfolgt dabei immer durch die Messung des in ihm enthaltenen Hypro's, das als Maß für den CLP-Gehalt des untersuchten Serums gilt.

2. Reagenzien

1. Äthanol abs., p.a.
2. Toluol, p.a.
3. 6 n HCl-Lösung, p.a.
4. 1 n HCl-Lösung, p.a.
5. 6 n H₂SO₄-Lösung, p.a.
6. Ba(OH)₂ als ges. wässrige Lsg., p.a.
7. 6 n NaOH-Lösung, p.a.
8. 1 n NaOH-Lösung, p.a.
9. KCl (Salz), p.a.
10. Natriumthiosulfat-Lsg., 3,6 m, p.a.
11. Boratpuffer, pH 8,7, p.a.
15,45 g Borsäure krist. (p.a.) und 56,20 g Kaliumchlorid (p.a.) in 200 ml aq. dest. lösen, mit 2 n KOH (p.a.) auf pH 8,7 einstellen und mit aq. dest. auf 250 ml auffüllen.
12. DL-Alaninlösung, pH 8,7 als 10 %ige Lösung:
10 g Alanin (p.a.) in 90 ml aq. dest. lösen, mit 2 n KOH (p.a.) auf pH 8,7 einstellen und mit aq. dest. auf 100 ml auffüllen.
13. Chloramin T-Lsg., 0,2 m, p.a.
(Die Lösung wird täglich neu angesetzt!)
14. Ehrlichs Reagenz:
Lösung I: 6,85 ml konz. H₂SO₄ (p.a.) und 50 ml Äthanol abs. (p.a.) bei 0° C mischen
Lösung II: 30,0 g p-Dimethylaminobenzaldehyd (p.a.) in 50 ml Äthanol abs. (p.a.) lösen

Nach Zusammengießen von I und II kann das Reagenz über max. 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Es ist vor Beginn der Versuche auf Zimmertemperatur zu erwärmen.

15. Hydroxyprolin-Standardlösung:

- a) Stammlösung: 10 mg Hydroxyprolin, krist.
(p.a.) in 100 ml aq. dest.
lösen
- b) Eichlösungen: Die Stammlösung wird im Verhältnis 1 : 20 bzw. 1 : 10 bzw. 1,5 : 10 verdünnt. 1 ml dieser Lösung enthält 5 bzw. 15 μ g Hydroxyprolin.

16. Dowex^{(R) *}

50 x 8, 200/400 mesh (dry), Ionenform H^+

*) Fluka AG, Buchs SG, Basel

3. Präparation des Ionenaustauschers

Das Austauschharz (Dowex 50 x 8, 200/400 mesh, H^+)

wird nacheinander

- a) mit dem zehnfachen Volumen 6 n NaOH,
- b) mit aq. dest., bis der pH-Wert des Waschwassers 7,0 beträgt,
- c) mit dem zehnfachen Volumen 6 n HCl und
- d) wieder mit aq. dest. gewaschen, bis der pH-Wert des Waschwassers 5,0 beträgt. Es kann sodann bis zur Benutzung unter aq. dest. aufbewahrt werden. Zur Herstellung der Austauschersäule wird das gewaschene Austauscherharz in eine Bürette mit 1 cm Innendurchmesser und senkrecht auslaufender Spitze gegeben. Die Höhe der Chromatographie-Säule beträgt 5 cm (s. Abb. 2). Vor jedem Versuch wird die Säule mit 10 ml 1 n HCl equilibriert.

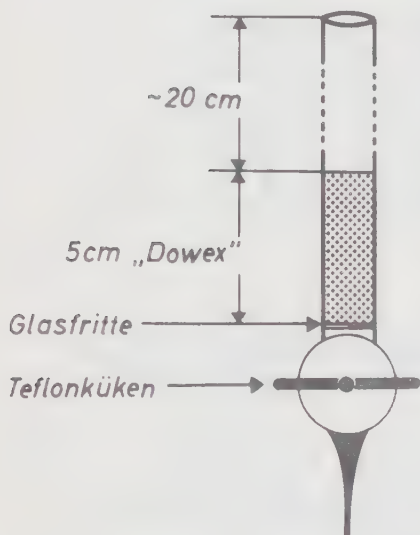


Abb. 2

Chromatographie-Säule

4. Vorversuche

In Vorversuchen wurde die Methode auf ihre Verwendbarkeit im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen überprüft. Dabei ergaben sich folgende Ge-

sichtspunkte: bei der Chromatographie der Eichlösungen wird das Hypro bis zu ca. 5 % irreversibel an einer unbenutzten Säule adsorbiert. Daher erwies sich als unumgänglich, sowohl die Eichlösung als auch die Probelösung zu chromatographieren, um somit vergleichbare Hypro-Werte zu erhalten. Im weiteren Gebrauch der Säule konnte dann festgestellt werden, daß die gemessenen Hypro-Werte einer gleichen Probelösung in Abhängigkeit von der Zahl der an derselben Säule durchgeführten Chromatographien zunehmen. Diese Ergebnisse (s. Abb. 3, S. 21) veranlaßten uns, den Ionenaustauscher jeweils nur einmal zu benutzen bzw. für jede Bestimmung eine neue Eichkurve anzufertigen.

Auf die von LeROY, KAPLAN, UDENFRIEND und SJOERDSMA (1964) speziell für die CLP-Bestimmung ausgearbeitete Mikromethode wurde verzichtet, da sich in Vergleichen zu der hier verwendeten Makromethode keine wesentlichen Unterschiede ergaben.

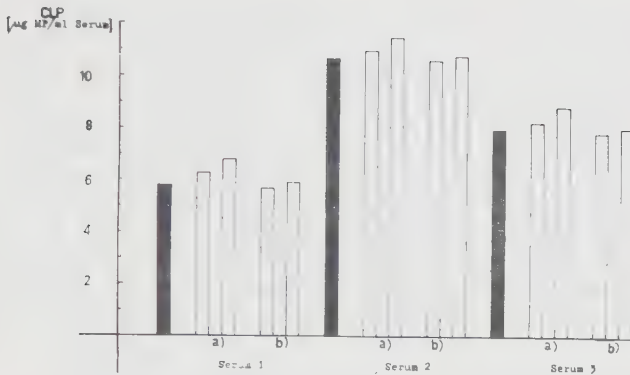


Abb. 3 Graphische Darstellung der CLP-Werte von 3 Seren bei 2 verschiedenen Bestimmungsmethoden

Die schwarze Säule in der Abbildung entspricht dem μg Hypro/ml der jeweiligen Seren, gemessen an einer unbenutzten Chromatographie-Säule. In a) wurde die gleiche Säule zur abermaligen Hypro-Bestimmung des zuvor schon über die Säule gelaufenen Serums benutzt, ohne zuvor eine neue Eichkurve für diese Säule aufzustellen. In b) wurde vor jeder Bestimmung des Hypro's eine neue Eichkurve aufgestellt.

5. Ausführung der Bestimmungen

aa) Eichkurve

Die Eichlösungen wurden durch Verdünnung der Stammlösung im Verhältnis 1 : 20 bzw. 1 : 10 bzw. 1,5 : 10 täglich neu angesetzt. Je 1 ml

dieser Eichlösungen, 5 bzw. 10 bzw. 15 μ g Hypro entsprechend, wurden mit 7 ml aq. dest. auf die Chromatographie-Säule gegeben und mit 5 ml 1 n HCl nachgespült. Nach Durchlaufen beider Lösungen wurde das gesamte Eluat verworfen. Sodann wurden weitere 20 ml 1 n HCl auf die Säule gegeben, das Eluat in 50 ml-Erlenmeyerkölbchen gesammelt, mit 1 n NaOH und Phenolphthalein als Indikator auf einen pH von annähernd 8,5 eingestellt und mit aq. dest. auf 50 ml aufgefüllt. Zur photometrischen Bestimmung des Hypro's wurden 8 ml dieser Lösung mit Kaliumchlorid gesättigt, der pH-Wert eventuell neu eingestellt, 2 ml Boratpuffer sowie 1 ml Alaninlösung hinzugegeben und dann mit 2 ml Chloramin T die Oxydation eingeleitet. Gestoppt wurde die Oxydation nach minimal 23 Minuten mit 6 ml Natriumthiosulfatlösung. Nach abermaligem Absättigen der Probe mit Kaliumchlorid wurden 10 ml Toluol hinzugefügt, das Ganze kräftig (100mal) geschüttelt und die Emulsion durch langsames Zentrifugieren gebrochen. Die obere der sich bildenden 2 Phasen, das Toluol, wurde abgezogen und verworfen. Das Gefäß mit der Probe wurde sodann verschlossen und für 30 Minuten in ein Wasserbad von 90° C gestellt. Nach Abkühlen der Lösung unter Wasser wurden wieder 10 ml Toluol hinzugegeben, das Ganze wieder kräftig geschüttelt und 10 Minuten

bei 3000 U/min zentrifugiert. Der klaren, überstehenden Toluolphase wurden 5 ml entnommen und diese in einem Reagenzglas mit 2 ml Ehrlichs Reagenz schnell vermischt. Nach 30 Minuten erfolgte die Bestimmung des Hypro's durch Extinktionsmessung am Zeiss Photometer (PMQ II) bei einer Wellenlänge von 560 m/ μ . Aus diesen Werten ergab sich dann die Eichkurve (s. Abb. 4).

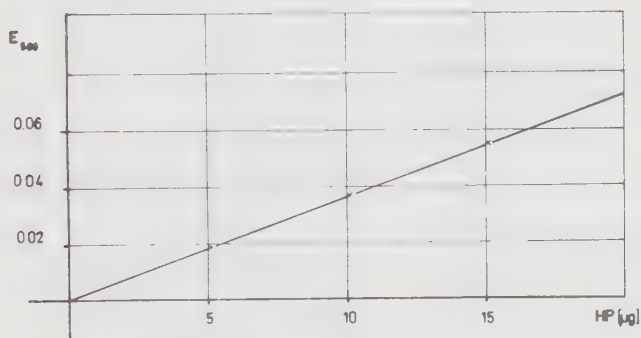


Abb. 4 Beispiel einer Hydroxyprolin-Eichkurve

bb) Bestimmungsansatz

Nach Auftauen des Serums bei Zimmertemperatur wurde 1 ml desselben mit 4 ml unterkühltem Äthanol versetzt und nach 15-minütigem Stehen bei 4° C 10 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert. Das ausgefällte

Protein wurde nach Abgießen des überstehenden Äthanol in 2 ml aq. dest. suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml gesättigter Ba(OH)_2 -Lösung erfolgte die Hydrolyse der Suspension in zugeschmolzenen Aufschlußkölbchen aus "Duran"-Glas (s. Abb. 5) über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 124°C . Die Neutralisation des Hydrolysats geschah nach Abkühlen unter Zugabe von Phenolphthalein als Indikator mit 6 n

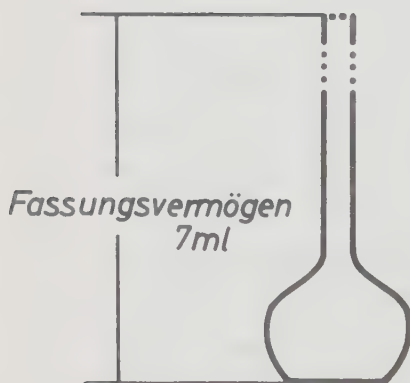


Abb. 5
Aufschlußkölbchen

H_2SO_4 . Dann wurden 0,2 ml 6 n HCl hinzugegeben und das ausgefällte BaSO_4 durch Zentrifugieren (3000 U/min über 10 Minuten) abgetrennt. Der Überstand wurde abgezogen und der BaSO_4 -Niederschlag nochmals mit 1 ml aq. dest. gewaschen. Überstand und Waschwasser wurden sodann gemeinsam chromatographiert, wobei das Gesamtvolumen zwischen 7 und 8 ml betrug.

Die weitere Bestimmung des Hypro's im CLP erfolgte entsprechend der Vorschrift zur Aufstellung der Eichkurve. Der der Eichkurve entnommene Hypro-Wert entsprach sodann dem CLP-Gehalt des Serums in $\mu\text{g Hypro/ml Serum}$.

IV. Statistische Verfahren^{*)}

Zur statistischen Beschreibung der erhaltenen Untersuchungsergebnisse wurden Durchschnittswerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) berechnet.

Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den nachstehend angeführten statistischen Verfahren:

- a. Korrelationsrechnung
- b. 1. Einfache Varianzanalyse
2. Kovarianzanalyse und Tuckey-Test
- c. Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

a. Korrelationsrechnung

Als Maß eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Größen x und y dient der Korrelationskoeffizient " r ". Sein absoluter Wert kann zwischen "0" und "1" liegen. Er wurde berechnet nach der Formel:

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

*) Einzelwerte und statistische Auswertung s. Tabellen im Anhang

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

"r" wurde auf Signifikanz geprüft, d.h. es wurde die Nullhypothese eines fehlenden Zusammenhangs untersucht. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn die Wahrscheinlichkeit (ermittelt auf Grund der vorhandenen Ergebnisse) eines fehlenden Zusammenhangs gleich oder kleiner als 1 % war ($P \leq 1 \%$).

Um unter Berücksichtigung der Streuung zu einer einfachen Beziehung zwischen beiden Größen zu gelangen, wurde eine Regressionsgerade berechnet. Sie paßt sich dem Schwarm der Beobachtungspunkte am besten an. Die Berechnung erfolgt nach der Methode der kleinsten Quadrate, bei der die Summe der Abweichungsquadrate zwischen den einzelnen Meßwerten und den entsprechenden Werten auf der Geraden ein Minimum wird.

Die Formel der Regressionsgeraden lautet:

$$Y_R = bx + a$$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

b = Regressionskoeffizient

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

a = Regressionskonstante
(Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate)

Mit Hilfe der Regressionsrechnung kann für jeden in Frage kommenden x-Wert der dazugehörige durchschnittliche y-Wert errechnet werden.

b. 1. Einfache Varianzanalyse

Um zu testen, ob zwischen den 6 Gruppen hinsichtlich der Gewichts-differenzen ein Unterschied besteht, wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt, da die graphische Prüfung keine Beziehung zum Anfangsgewicht (Ag) ergeben hatte ($P \leq 1\%$).

2. Kovarianzanalyse und Tuckey-Test^{*)}

Um zu testen, ob zwischen den 6 Gruppen hinsichtlich des CLP-Gehaltes im Serum Unterschiede bestehen, wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Hierbei wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen hinsichtlich des CLP das Ag als Kovariable betrachtet. Die gesamte Streuung der Zielgröße und der Kovariablen wurde dazu in die Streuung zwischen und innerhalb der Gruppen aufgeteilt. Bei den Streuungskomponenten der Zielgröße, dem CLP, kann mittels der Kovarianzanalyse der Anteil in Abzug gebracht werden, der durch einen linearen

^{*)} Statistische Auswertung und Formeln nach KOLLER (1964), LI (1964), LINDER (1960) und SNEDECOR (1959)

Zusammenhang zwischen Ag und CLP erklärt wird. Es ist dann möglich, unter Berücksichtigung des Ag zu testen, ob zwischen den Werten der Zielgröße, d.h. dem CLP, in den Behandlungsgruppen wesentliche Unterschiede vorliegen. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wählten wir auch hier 1 % ($P \leq 1\%$). Die Prüfung besagt bei signifikantem Ausfall zunächst nur, daß zwischen mindestens 2 Gruppen wesentliche Unterschiede vorhanden sind, nicht jedoch, welcher Vergleich im einzelnen statistisch gesichert ist. Zur Prüfung dieser Frage diente der Tuckey-Test, angewandt auf die Ergebnisse der Kovarianzanalyse nach den Angaben von SNEDECOR (1959).

c. Wilcoxon-Test

Das Prinzip beruht auf der Zuteilung von Rangnummern zu den Einzelwerten der zu vergleichenden Gruppen. Haben mehrere Meßwerte den gleichen Wert, dann wird an sie gleichmäßig der Mittelwert ihrer Anordnungszahlen vergeben. Die Numerierung erfolgt ohne Rücksicht darauf, ob der Fall in der unbehandelten oder behandelten Gruppe steht. Aus den Rangnummern bei- der Gruppen werden die Summen gebildet. Eine dieser

Summen dient als Prüfgröße. Mit ihr wurde in die entsprechende Tabelle der Documenta Geigy, 6. Auflage (1966), eingegangen ($P \leq 1 \%$).

V. Ergebnisse

Einen Überblick über die Ergebnisse der Untersuchungen an Tier und Mensch vermitteln Abbildung 6, S. 31, und Abbildungen 7 und 8, S. 32. Nachdem die Unterschiede graphisch auffielen, wurden die Ergebnisse im einzelnen rechnerisch auf Signifikanz geprüft.

a. Tierversuche

1. Zuerst interessierte die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Endgewicht (Eg) und CLP-Gehalt im Serum (CLP) bei 60 unbehandelten Ratten, deren Gewichtsverteilung bei 82,7-300 g lag. Zur Untersuchung einer Abhängigkeit zwischen diesen beiden Größen wurde eine Korrelationsrechnung durchgeführt. Als zu untersuchende Größen lagen hier pro Ratte $x = \text{Eg}$ und $y = \text{CLP}$ als Einzelwerte im Serum vor. Die Rechnung ergab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CLP-Abfall und steigendem Eg (r^*) = - 0,98; $P \leq 1 \%$; hierzu s. auch Abb. 6, S. 31, und Tab. 5, S. 33). Da eine positive Ab-

*) Ein rechnerisches Maß für einen linearen Zusammenhang stellt der Bravais Pearsonsche Korrelationskoeffizient r dar.

hängigkeit des Gewichtes vom Alter aus der Literatur ersichtlich ist (SOBEL, ZUTRAUEN und MARMORSTON, 1963) folgt somit, daß mit steigendem Alter der CLP-Gehalt im Serum abfällt.

2. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem CLP-Gehalt im Serum der Kontrollgruppe und den behandelten Tieren aufzeigen zu können, wurde wie folgt vorgegangen:

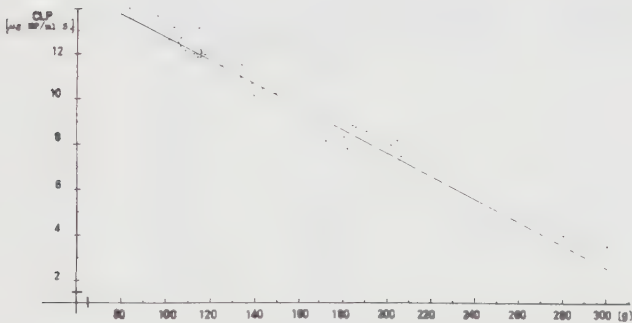


Abb. 6 Graphische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Gewicht und CLP-Gehalt im Serum von Ratten

Eingezeichnet wurde die Regressionsgerade $y_R = -0,05x + 17,6$ für das Intervall 82,7 bis 300 g (y_R = theoretisch errechneter CLP-Gehalt im Serum, x = Endgewicht in g).

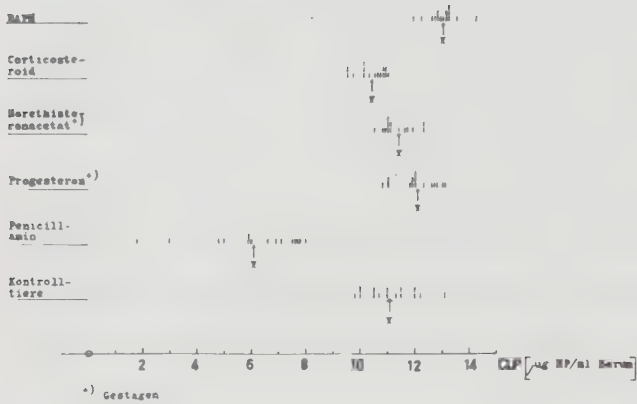


Abb. 7 Graphische Darstellung des CLP-Gehaltes im Serum der verschiedenen Behandlungsgruppen sowie der Kontrolltiere

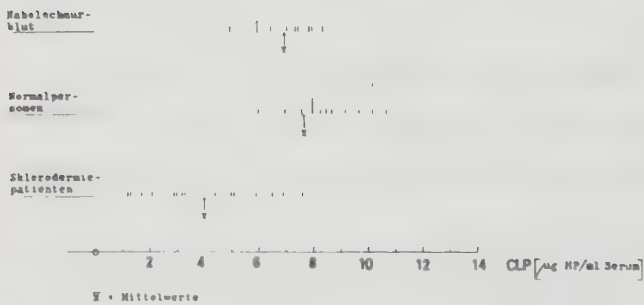


Abb. 8 Graphische Darstellung des CLP-Gehaltes im Serum von Kontrollpersonen und Sklerodermiepatienten

Lfd.Nr.	End- gewicht	CLP ^{*)}	Lfd.Nr.	End- gewicht	CLP ^{*)}
1	82,7	14,0	31	107,0	12,5
2	95,5	13,7	32	110,0	11,7
3	103,0	13,2	33	115,0	12,1
4	106,0	12,7	34	113,0	12,2
5	111,3	12,5	35	115,0	11,9
6	113,0	12,0	36	106,0	12,0
7	114,2	12,2	37	112,0	12,0
8	117,7	12,0	38	108,0	12,1
9	119,0	12,2	39	106,0	12,4
10	120,0	12,0	40	113,0	11,9
11	124,5	11,5	41	98,0	13,0
12	130,0	11,0	42	112,0	11,8
13	133,0	11,0	43	105,0	12,8
14	139,0	10,2	44	183,0	7,4
15	142,5	10,5	45	187,0	7,4
16	149,5	10,3	46	181,0	7,8
17	156,8	8,9	47	182,0	7,6
18	172,0	8,2	48	183,0	8,7
19	180,0	8,4	49	185,0	8,6
20	184,0	8,7	50	195,0	8,6
21	190,0	7,5	51	196,0	8,8
22	195,0	7,6	52	196,0	8,4
23	201,0	8,0	53	185,0	8,7
24	203,0	8,2	54	190,0	8,6
25	206,0	7,5	55	133,0	11,5
26	280,0	4,0	56	137,0	10,0
27	285,0	4,5	57	134,0	11,3
28	300,0	3,5	58	138,0	10,7
29	101,0	12,6	59	142,5	10,0
30	105,0	12,5	60	114,0	13,1

$$y_r = bx + a = -0,05x + 17,6$$

$$x_r = b'y + a = -19,4y + 349,4$$

$$r = -0,98$$

^{*)} Angabe des CLP in μg Hypro/ml Serum

Tab. 5 Meßwerte von Endgewicht und CLP^{*)}-Gehalt im Rattenserum in der Altersabhängigkeitsbestimmung bei 60 unbehandelten Tieren

2 a. Zunächst wurde geprüft, ob sich die Differenzen zwischen Anfangsgewicht (Ag) und Endgewicht (Eg) in den Gruppen wesentlich unterscheiden. Dies erforderte die Prüfung, ob die Differenz Eg minus Ag eine Beziehung zum Ag aufweist (s. Abb. 9). Die Abbildung 9 zeigt, daß dies nicht der Fall war. Infolgedessen wurde nur eine einfache Varianzanalyse der Differenzen Eg minus Ag (als Variable) vorgenommen. Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($F = 37,35$; $fg = 84$; $P \leq 1\%$).

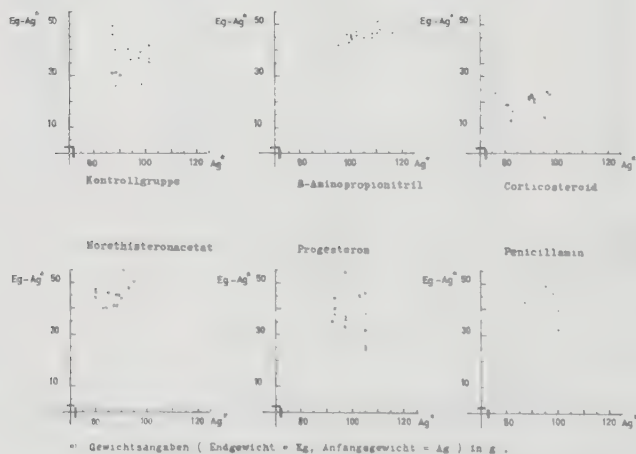


Abb. 9 Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der Differenz Endgewicht (Eg) minus Anfangsgewicht (Ag) und Alter in den Behandlungsgruppen

Wie schon aus der graphischen Darstellung (Abb. 9) hervorgeht, zeigt sich hier besonders bei der Gruppe mit Corticosteroidtherapie eine statistisch signifikant geringere Gewichtszunahme *) gegenüber den übrigen Tieren.

2 b. Die Abbildung 10 läßt nun eine deutliche Abhängigkeit des CLP vom Ag erkennen. Folglich mußte das Ag bei der weiteren Auswertung als Begleitvariable ausgeschaltet werden. Das CLP zeigt - wie aus Abbildung 11 (s. S. 36) hervorgeht - eine Beziehung zum Eg auch bei den verschiedenen Behandlungsgruppen. Da aber das Eg durch die Behandlung

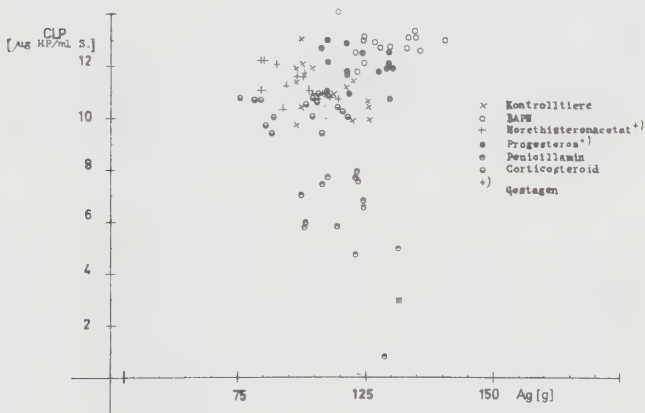


Abb. 10 Graphische Darstellung der Beziehung des CLP-Gehaltes im Serum und des Anfangsgewichts (Ag) in den Behandlungsgruppen

*) Die Ergebnisse sind nach dem Vorzeichentest statistisch signifikant.

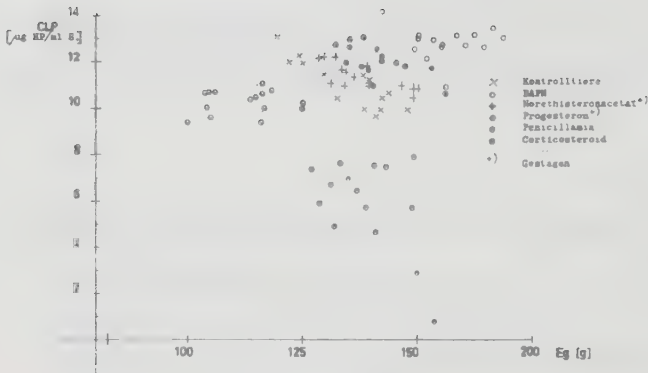


Abb. 11 Graphische Darstellung der Beziehung CLP-Gehalt im Serum und Endgewicht (Eg) in den Behandlungsgruppen

Gruppe	1	2	3	4	5	6
1		3,52	2,50	1,18	7,25	2,42
2			1,01	2,33	3,74	1,09
3				1,32	4,75	0,08
4					6,07	1,24
5						4,83
6						

Tab. 7 Ergebnisse des T u c k e y - Tests

Alle Werte, die größer oder gleich 1,11 sind, gelten als statistisch signifikant.

selbst beeinflußt wird, erschien es sinnvoller, das Ag als Kovariable auszuschalten. Die unter diesen Voraussetzungen durchgeführte Kovarianzanalyse ergab wesentliche Unterschiede des CLP-Gehaltes im Serum zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen ($F = 103,9$; $df = 84$; $P \leq 1 \%$; s. Tab. 6, S. 66).

Der auf diesem Ergebnis aufbauende T u c k e y - Test erscheint mit seinen Resultaten in Tabelle 7. Man sieht, daß bei der Ausschaltung des Ag die CLP-Werte der Gruppen 1 (BAPN), 4 (Progesteron) und 5 (Penicillamin) sich jeweils von denen der Kontrollgruppe (6) statistisch signifikant ($P \leq 1 \%$), die CLP-Werte der Gruppe 2 (Corticosteroid) statistisch auffällig ($1 \% \leq P \leq 5 \%$) unterscheiden. Die CLP-Werte der Gruppe 3 (Norethisteronacetat)*) weisen jedoch keine abweichende Tendenz von der Gruppe der Kontrolltiere (6) auf (s. hierzu Tab. 8).

*) Von den hier untersuchten Gestagenen ließ das Norethisteronacetat keine Beeinflussung des CLP-Gehaltes im Serum erkennen und wurde deshalb in der Diskussion der Ergebnisse nicht weiter berücksichtigt.

Gruppe	Zahl der Bestimmung.	^{*)} $\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Signifik. Einzelwerte zu Gr. 6 s. auch Tab.	
(1) BAPN	15	12,96	$\pm 0,53$	0,19	$P \leq 1 \%$	8 a
(2) Corticosteroid	15	10,36	$\pm 0,56$	0,15	$1\% \leq P \leq 5\%$	8 b
(3) Norethisteronac.	15	11,39	$\pm 0,58$	0,15	$P \geq 5 \%$	8 c
(4) Progesteron	15	12,07	$\pm 0,72$	0,19	$P \leq 1 \%$	8 d
(5) Penicillamin	15	6,11	$\pm 1,76$	0,45	$P \leq 1 \%$	8 e
(6) Kontrollgruppe	15	11,14	$\pm 0,93$	0,24	$\emptyset$	8 f

*) CLP gemessen in μg Hypo/ml Serum

Tab. 8 CLP-Gehalt im Serum von mit BAPN, Corticosteroid, Gestagen und Penicillamin behandelten Ratten sowie der Kontrollgruppe

2 c. Es interessierte nun weiter die Frage, wie der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppen ausgefallen wäre, wenn die Kontrollgruppe jeweils das gleiche durchschnittliche Endgewicht gehabt hätte wie die zum Vergleich stehende behandelte Gruppe, die Streuung der Einzelwerte jedoch hinsichtlich des CLP und des Eg in der Kontrollgruppe gleich wäre.

1. Zur Prüfung dieser Frage wurde von der Regression zwischen Eg und CLP-Gehalt der Gruppe 7 ausgegangen (s. Abb. 6, S. 31).
2. Man verwendet zum Vergleich aus der Gesamtheit der Kontrolltiere die Tiere gleichen Alters (Gewichts).
3. Die Punkte dieses Unterkollektivs werden auf der Regressionslinie zwischen Eg und CLP der Kontrolltiere so verschoben, daß das durchschnittliche Eg dieses Teilkollektivs der Kontrolltiere mit dem jeweiligen durchschnittlichen Eg der Behandlungsgruppe übereinstimmt.
4. In der neuen Position der Kontrollgruppe im Koordinatensystem kann auf die Ordinate das Lot der Einzelwerte gefällt und die sich ergebenden CLP-Werte mit denen der Behandlungsgruppe verglichen werden. Wie hierzu aus den graphischen Darstellungen der Abbildungen 12 a, b, c, d und e der einzelnen Vergleiche zu ersehen ist, unterscheiden sich die CLP-Werte der Kontrollgruppe nach graphischer Berücksichtigung des Eg noch deutlicher von denen der Behandlungsgruppe als bei der Kovarianzanalyse.

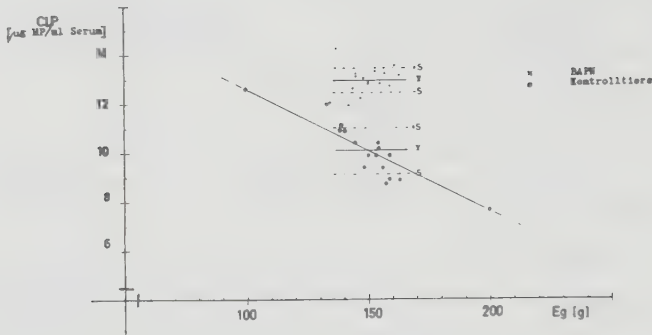


Abb. 12 a Vergleiche der CLP-Werte im Serum der Kontrollgruppe und der BAPN-Behandlungsgruppe unter graphischer Anpassung der Endgewichte (Eg) der Kontrollgruppe an die Eg der BAPN-Behandlungsgruppe

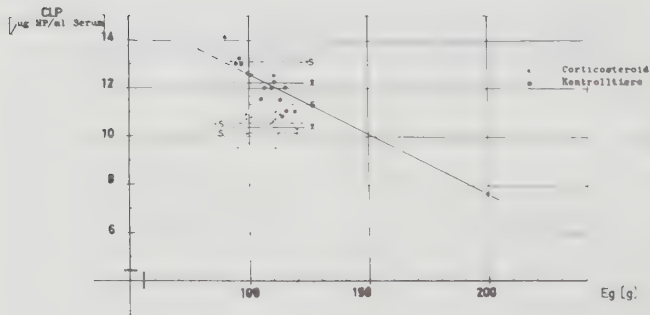


Abb. 12 b Vergleiche der CLP-Werte im Serum der Kontrollgruppe und der Corticosteroid-Behandlungsgruppe unter graphischer Anpassung der Endgewichte (Eg) der Kontrollgruppe an die Eg der Corticosteroid-Behandlungsgruppe

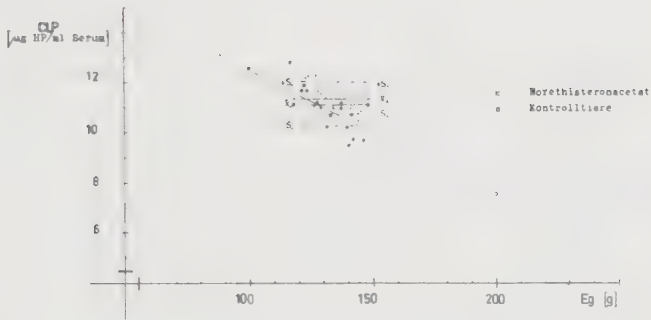


Abb. 12 c Vergleiche der CLP-Werte im Serum der Kontrollgruppe und der Norethisteronacetat-Behandlungsgruppe unter graphischer Anpassung der Endgewichte (Eg) der Kontrollgruppe an die Eg der Norethisteronacetat-Behandlungsgruppe

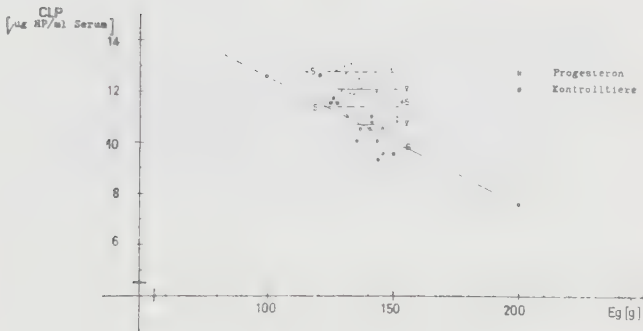


Abb. 12 d Vergleiche der CLP-Werte im Serum der Kontrollgruppe und der Progesteron-Behandlungsgruppe unter graphischer Anpassung der Endgewichte (Eg) der Kontrollgruppe an die Eg der Progesteron-Behandlungsgruppe

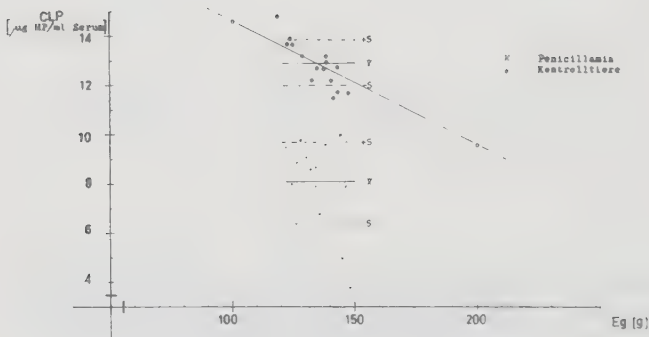


Abb. 12 e Vergleiche der CLP-Werte im Serum der Kontrollgruppe und der Penicillamin-Behandlungsgruppe unter graphischer Anpassung der Endgewichte (Eg) der Kontrollgruppe an die Endgewichte der Penicillamin-Behandlungsgruppe

b. Kontrollpersonen *)

Bei insgesamt 25 Personen wurden CLP-Werte bestimmt. Der CLP-Gehalt im Serum von 10 Neugeborenen (4 ♀, 6 ♂, Nabelschnurblut) betrug im Mittel $6,98 \pm 1,08$ μg Hypro/ml Serum, der der 15 Kontrollpersonen zwischen 20 und 60 Jahren (5 ♀, 10 ♂) $7,9 \pm 1,2$ μg Hypro/ml Serum (s. Tab. 9 a und b, S.73). Eine Abhängigkeit des CLP-Gehaltes im Serum vom Geschlecht war innerhalb der Kollektive nicht zu erfassen.

Bei der Altersabhängigkeitsbestimmung des CLP ergab sich eine Abhängigkeit insofern, als der CLP-Gehalt des Nabelschnurblutes gegenüber dem CLP-Gehalt des Serums des Kollektivs der 21-30jährigen statistisch signifikant erniedrigt ist. Dieser Anstieg des CLP zum Kollektiv der 21-30jährigen geht in einen statistisch auffälligen CLP-Abfall zum Kollektiv der 31-40jährigen über. Der weitere CLP-Abfall ließ sich dann nur noch infolge der geringen Fallzahl graphisch erfassen (s. Abb. 13).

*) Die statistischen Auswertungen erfolgten nach dem Wilcoxon-Test.

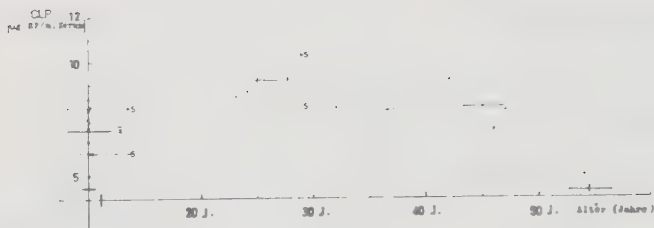


Abb. 13 Streuungsdiagramm der Zusammenhänge des CLP-Gehaltes im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Kontrollpersonen

c. Sklerodermiepatienten *)

Was die Untersuchungsgruppe von Patienten mit circumscripiter und progressiver Sklerodermie anbetrifft, so zeigte sich hier eine statistisch signifikante Erniedrigung der CLP-Werte ($P \leq 1\%$) im Serum gegenüber den Kontrollpersonen (s. Abb. 8, S. 32 und Tab. 10, S. 45). Es wurde ein Mittelwert des CLP von $4,0 \pm 2,1$ µg Hypro/ml Serum ermittelt.

*) Die statistischen Auswertungen erfolgten nach dem Wilcoxon-Test.

Gruppe	Zahl der Bestimmg.	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	Signifik.	Einzelwerte s.auch Tab.
Sklerodermie	15	4,0	$\pm 2,1$	0,54	$P \leq 1 \%$	10 a, b
Kontrollgruppe	15	7,9	$\pm 1,2$	0,34	$\emptyset$	9 a

Tab. 10 CLP-Gehalt im Serum von Sklerodermiepatienten und Kontrollpersonen

Es ergab sich, daß die Sklerodermiepatienten signifikant älter waren als die Kontrollpersonen. Die Möglichkeit eines durch diesen Sachverhalt bedingten CLP-Abfalls gegenüber den Kontrollpersonen wurde insofern ausgeschlossen, als ein Vergleich zwischen 2 gleichaltrigen Gruppen von je 11 aus dem ursprünglichen Untersuchungsgut ausgewählten Patienten durchgeführt wurde. Auch hier ergab sich ein statistisch signifikanter CLP-Abfall ($P \leq 1 \%$) im Serum gegenüber den Kontrollpersonen (s. Tab. 10 c, S. 76). So konnte der Einfluß des Alters weitgehend ausgeschlossen werden. Der aus Tabelle 4, S. 15, ersichtliche Unterschied in bezug auf die Geschlechtsverteilung wurde außer Betracht gelassen, da innerhalb der Kollektive eine Abhängigkeit der CLP-Werte vom Geschlecht nicht festgestellt werden konnte und im übrigen bekannt ist, daß die Sklerodermie überwiegend das weibliche Geschlecht befällt.

Bei Kranken mit progressiver Sklerodermie, bei denen sich der CLP-Gehalt des Serums unter Gestagentherapie (Primolut^(R)-Nor, 15 mg/die) gemessen wurde, zeigte sich bei der Bestimmung nach ca. 1 Woche ein statistisch auffälliger Anstieg des CLP^{*} (s. Abb. 14 und Tab. 11).

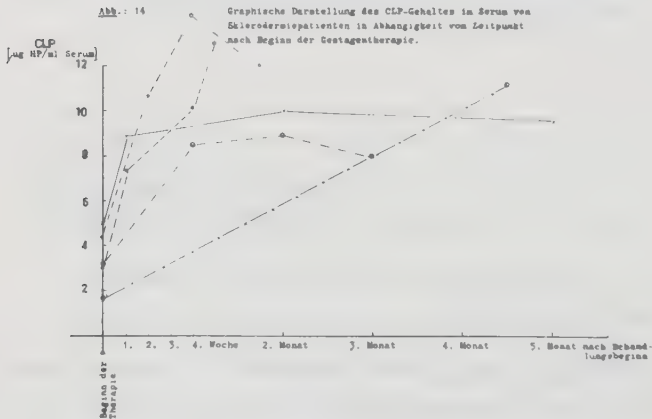


Abb. 14 Graphische Darstellung des CLP-Gehaltes im Serum von Sklerodermiepatienten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Beginn der Gestagentherapie

*) Nach dem Vorzeichentest sind die Ergebnisse statistisch auffällig.

VI. Diskussion

Um nun diese Ergebnisse im einzelnen diskutieren zu können, erscheint es uns wichtig, die in diesem Zusammenhang bisher erarbeiteten Befunde über die Wirkung bindegewebswirksamer Substanzen auf den Kollagenstoffwechsel ausführlich darzustellen und zu erörtern.

Unter der Einwirkung lathyrogener Substanzen auf das Kollagen wird von verschiedenen Autoren übereinstimmend eine Vermehrung der neutralsalzlöslichen Fraktion gefunden (LEVENE u. GROSS, 1959; MIKKONEN, TUOMINEN u. KULONEN, 1960; BOLOGNANI u. PONSETTI, 1962; DASLER, STONER u. MILLISER, 1961). Quantitative Bestimmungen der einzelnen Kollagenfraktionen in der Haut von mit β -Aminopropionitril (BAPN) behandelten Ratten ergaben ebenfalls, daß die löslichen Vorstufen stark erhöht sind (KÜHN, HOLZMANN u. KORTING, 1962). Am Einbau von ^{14}C -Glycin in das Kollagen der Rattenhaut konnte festgestellt werden, daß die intracelluläre Kollagensynthese nicht geschädigt, sondern im Gegenteil stark beschleunigt wird.

Weiterhin kommt es infolge einer Blockierung der intermolekularen Quervernetzungen durch BAPN zu einem verzögerten Übergang des neutralsalzlöslichen Kollagens (NLK) in das säurelösliche (SLK) und unlösliche Kollagen (ULK), was somit eine Vermehrung der löslichen Kollagenvorstufen bedingt. Neben der Ausbildung der intermolekularen Bindungen, die für das Unlöslichwerden des Kollagens verantwortlich sind, ist jedoch auch die Ausbildung der intramolekularen Bindungen gestört. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß die SLK-Fraktion aus der Haut lathyritischer Ratten im Gegensatz zu der von Normaltieren im Sedimentationsdiagramm keine β -Komponente aufweist.

Eine Folge des langsamen Übergangs zum unlöslichen Kollagen bei lathyritischen Ratten scheint sodann der starke Abbau der NLK-Fraktion zu sein. Gelöste Kollagenmoleküle sind bei Körpertemperatur gegen Pepsin, Trypsin, Papain und Ficin (KÜHN, SCHUPPLER u. KÜHN, 1964) sowie Kathepsin (FRANKLAND u. WYNN, 1962) nicht beständig. Um einem Abbau zu entgehen, müssen sich die Kollagenmoleküle zu Aggregaten oder Fibrillen zusammenlagern und so ihre Dreikettenstruktur stabilisieren. Da eine derartige Stabilisierung unter dem Einfluß von BAPN jedoch verzögert

ist, erfolgt ein verstärkter Abbau der löslichen Kollagenfraktion, an dem auch die beim Lathyrismus erhöhten Kathepsin- (HOLZMANN, KORTING u. MORSCHES, 1965) und Leucinaminopeptidase-Aktivitäten (MORSCHES, HOLZMANN, KORTING u. BRAUN, 1966) beteiligt sein könnten. Als Zeichen eines solchen gesteigerten Kollagenabbaues konnten MARTIN, MERGENHAGEN und PROCKOP (1961), JASIN und ZIFF (1962) sowie ORBISON, McCRARY und CALLAHAN (1965) bei lathyritischen Ratten eine vermehrte Hydroxyprolinausscheidung im Urin feststellen.

Bei den Corticosteroiden finden wir, hervorgerufen durch den antianabolen Effekt dieser Substanz, eine stark verringerte Gewichtszunahme (SMITH, 1962, 1964; CADAVID, 1964) sowie einen verringerten Gehalt der nichtkollagenen Proteine (MANNER u. GOULD, 1965). Zum anderen besteht ein spezifischer Effekt auf die extrazelluläre Reifung und Alterung des Kollagens in Form einer verstärkten Faserreifung. Diesen Befunden entsprechen auch die Ergebnisse von VOGEL (1964), VOGEL und THER (1963 a, 1963 b) sowie THER, SCHRAMM und VOGEL (1963), die unter dem Einfluß von Corticosteroiden eine erhöhte Bruchfestigkeit des Diaphysenschaftes und eine erhöhte Reißfestigkeit

der Epiphysenfuge von Ratten feststellen konnten.

Die Untersuchungen von KÜHN, IWANGOFF, HAMMERSTEIN, STECHER, DURRUTI, HOLZMANN und KORTING (1964), KÜHN (1965) und KIVIRIKKO, LAITINEN, AER und HALME (1965) über den Kollagenstoffwechsel unter einer Corticoidmedikation bei Ratten verdeutlichen diese Vorgänge. Die Autoren konnten nämlich zeigen, daß es bei Ratten unter dieser Behandlung innerhalb der Kollagenfraktion zu einer Abnahme der NLK-Fraktion im Bindegewebe (SIUKO, SÄVELÄ u. KOLONEN, 1959; HOUCK, 1962; GÜNTHER u. CARSTEN, 1961; KÜHN, HOLZMANN u. KORTING, 1962; HOUCK u. JACOB, 1963) kommt, bedingt durch einen beschleunigten Übergang in den unlöslichen Zustand der Fibrillen, d.h. die Ausbildung intra- und intermolekularer Bindungen. Die ULK-Fraktion sowie die Gesamtkollagenfraktion wurden bei verminderter Synthese des Kollagenmoleküls vermehrt vorgefunden (ITO, 1964; MANNER u. GOULD, 1965; SMITH u. ALLISON, 1965). In der Hypro-Senkung im Urin (KIVIRIKKO u. LAITINEN, 1965; HARTMANN, 1966) sowie einer Hypro-Erniedrigung im Serum (KIVIRIKKO, LAITINEN, AER u. HALME, 1965; LAITINEN, NIKKILÄ u. KIVIRIKKO, 1966) von mit Corticosteroid behandelten Ratten sind die objektiven Zeichen eines verminder-

ten Kollagenabbaues zu sehen. Auch erzielten LeROY und WOLFF (1966) durch eine Corticosteroidtherapie eine Erniedrigung der Plasma-CLP-Werte.

Aus quantitativen Bestimmungen einzelner Kollagenfraktionen nach Gestagengaben geht hervor, daß die löslichen Vorstufen des Kollagens erhöht sind (HOLZMANN, KORTING, HAMMERSTEIN, STECHER, DURRUTI, IWANGOFF u. KÜHN, 1964), während die Synthese des Kollagenmoleküls in der Zelle kaum beeinflußt bzw. nur gering erhöht ist (KÜHN, STECHER, IWANGOFF, HAMMERSTEIN, DURRUTI, HOLZMANN u. KORTING, 1965), was durch den Einbau von ^{14}C -Glycin in das Kollagen der Rattenhaut nachgewiesen werden konnte. BUKHANOVA (1962) teilt unter einer Desoxycorticosteron-Therapie, einem Hydroxyprogesteron, gleichlautende Befunde mit. Im extrazellulären Stoffwechsel zeigt sich insofern ein deutlicher Effekt, als der Übergang von löslichem in unlösliches Kollagen, d.h. die Ausbildung intermolekularer Bindungen verzögert ist. Auch hier kommt es, wie schon zuvor beim BAPN erwähnt, als Folgeerscheinung des verlangsamten Übergangs in die unlösliche Kollagenfraktion zu einem verstärkten Abbau der NLK-Fraktion, an dem, wie gezeigt werden konnte, auch proteolytische Fermente beteiligt sind (HOLZMANN, MORSCHES u. KORTING,

1965; MORSCHES, HOLZMANN, KORTING u. BRAUN, 1966).

Weiterhin berichten HOLZMANN, KORTING und MORSCHES (1965) als Zeichen eines vermutlich verstärkten Abbaus der NLK-Fraktion von einer Erhöhung der Hypro-A bei Sklerodermiekranken, die unter einer Gestagentherapie standen. In diesem Zusammenhang ist vielleicht auch noch erwähnenswert, daß KOWALEWSKI (1965) eine Hypro-A-Erhöhung bei Ratten mitteilt, die unter einer anabolen Steroidtherapie standen.

Hinsichtlich der Wirkung von Penicillamin auf den Kollagenstoffwechsel des Bindegewebes berichten NIMNI und BAVETTA (1965) und NIMNI (1965) von einer signifikanten Erhöhung der NLK-Fraktion bei einer kompensatorischen Erniedrigung der ULK-Fraktion, einer signifikanten Verminderung der Kollagensynthese und einer gestörten Ausbildung der intramolekularen Quervernetzungen. Diese Befunde erscheinen jedoch nicht ganz frei von Widersprüchen und nicht ohne weiteres verständlich zu sein.

Die Effekte der hier besprochenen bindegewebswirk-

samen Substanzen lassen sich nun wie folgt zusammenfassen:

Nach Applikation von BAPN und Gestagenen kommt es zu einer Steigerung der Kollagensynthese und infolge eines verzögerten Übergangs der NLK-Fraktion in die ULK-Fraktion zu einer Erhöhung der NLK-Fraktion, die gleichzeitig einem verstärkten Abbau unterliegt. Als Folge hiervon kann auch eine vermehrte Hypro-A festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu zeichnet sich die Wirkung der Corticosteroide auf den Kollagenstoffwechsel des Bindegewebes durch eine Verminderung der Kollagensynthese und einen beschleunigten Übergang der NLK-Fraktion in die ULK-Fraktion aus, so daß erstere quantitativ erniedrigt ist, was auch an der verringerten Hypro-A abzulesen ist. Bezüglich des Penicillamins liegen ausführliche Untersuchungen über die Dynamik des Kollagenstoffwechsels, insbesondere über die Beeinflussung des Überganges der NLK-Fraktion in die ULK-Fraktion unseres Wissens noch nicht vor. Jedoch lassen die bisher von NIMNI und BAVETTA (1965) und NIMNI (1965) erhobenen Befunde (s.o.) hinsichtlich der Kollagenfraktionen und der intramolekularen Quervernetzungen auf eine dem BAPN ähnliche Wirkungsweise, zumindest was den Kollagenstoffwechsel anbetrifft,

schließen, wenn auch hier detaillierte Angaben noch nicht gemacht werden können.

Versucht man nun, die im Rahmen dieser Untersuchungen erarbeiteten Ergebnisse über den CLP-Gehalt des Rattenserums nach Anwendung von BAPN, Corticosteroid, Gestagen und Penicillamin in das bisherige Wissen über die Einwirkung dieser Substanzen auf den Kollagenstoffwechsel des Mesenchyms einzuordnen, so läßt sich feststellen, daß das Verhalten des Serum-CLP wie auch der Hypro-A den Veränderungen der einzelnen Kollagenfraktionen, der Reifung des Kollagens wie auch der Beeinflussung der Kollagensynthese durch die verschiedenen Substanzen mit Ausnahme des Penicillamins weitgehend parallel geht (s. Abb. 15, S. 55).

Ein solches, den Veränderungen im Kollagenstoffwechsel eindeutig zuzuordnendes und korreliertes Verhalten des CLP im Serum und der Hypro-A zeigte sich auch bei den Untersuchungen über den CLP-Gehalt im menschlichen Serum in Abhängigkeit vom Alter^{*)}.

*) Die altersabhängigen Veränderungen hinsichtlich des Kollagenstoffwechsels im Bindegewebe äußern sich in einer verstärkten Ausbildung der inter- und intramolekularen Bindungen und damit in einer Zunahme der ULK-Fraktion, wobei gleichzeitig der Anteil der löslichen Kollagen-Fraktion abnimmt.

Kollagen		Kollagenfraktionen			Gesamt Kollagen	Hydroxyprolin			Substanz
Synthese	Reifung	ULK	SLK	NLK		CLP*	1. Serum	1. Urin	
↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑*	○	↑	β-Amino- propionitril
↓	↑	↑	↓	↓	↑	↓*	↓	↓	Cortico- steroid
↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑*	○	↑	Gestagen
↓	○	↓	○	↑	○	↓*	○	○	Penicill- amin

Abb. 15 Schematische Darstellung zum Verhalten des Kollagenstoffwechsels und der einzelnen Kollagenfraktionen der Rattenhaut nach Anwendung einiger Bindegewebs-therapeutika

Zeichenerklärung:

↑ = erhöht

↓ = erniedrigt

○ = nicht bekannt

*) Ergebnisse aus unseren Versuchsreihen

Während eine altersabhängige Abnahme der Hypro-A beim Menschen bereits von verschiedenen Autoren (EMMICH, 1959; BUDDECKE u. RUFF-LICHTENSTEIN,

1963; RAVENNI, RUBEGNI u. GIOVANE, 1962 a; JONES, BERGMAN, KITTNER u. PIGMAN, 1964) beschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit auch für den CLP-Gehalt des menschlichen Serums zumindest eine graphisch zu erfassende Tendenz eines CLP-Abfalls mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich auch bei der Ratte eine statistisch gesicherte CLP-Abnahme im Serum mit zunehmendem Alter.

Einzig das Penicillamin läßt sich nicht in die hier aufgeführten Zusammenhänge einfügen, da hier trotz einer Vermehrung der NLK-Fraktion (NIMNI u. BAVETTA, 1965; NIMNI, 1965) erniedrigte CLP-Werte im Serum gefunden wurden. Da jedoch, wie bereits erwähnt, die Einwirkung des Penicillamins auf den Reifungsprozeß des Kollagens bisher nicht näher untersucht wurde, ist eine Deutung der hier erhobenen Befunde nicht möglich.

Auf Grund dieser Befunde kann also angenommen werden, daß die Kollagensynthese, vor allem aber das infolge einer veränderten Reifung vermehrte oder verminderte Vorliegen der NLK-Fraktion und deren

Abbau nicht nur - wie bereits erwähnt - die Hypro-A, sondern auch den CLP-Gehalt des Serums wesentlich beeinflussen. Dies würde aber bedeuten, daß beide Parameter einem gemeinsamen Kollagen-Pool entstammen und nicht, wie von LeROY und SJOERDSMA (1965) angenommen, dem CLP ein eigener Pool zuzuordnen ist.

Vergleicht man nun die bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen, wie z.B. Neoplasien - insbesondere mit Affektionen des Knochens - sowie ossären Krankheitsvorgängen (8, 11, 21, 36, 37, 54, 66, 67, 68, 69, 84, 88, 95, 97, 98, 105, 106), innersekretorischen Stoffwechselentgleisungen (3, 13, 45, 47, 54, 66, 106) als auch entzündlich fieberhaften Allgemeinerkrankungen (24, 25, 31, 66, 106) vermehrt bzw. vermindert auftretenden Hypro-A-Werte mit den von LeROY et al. (70, 71, 72, 73) bei diesen Krankheiten angegebenen CLP-Werten im Serum, so zeigt sich auch hier eine auffallende Korrelation zwischen diesen beiden Parametern des Kollagenstoffwechsels, die für die zuvor geäußerte Annahme bezüglich des CLP-Pools sprechen würden.

Weiterhin deutet das auffällige Verhalten der Hypro-A und des CLP bei Nierenfunktionsstörungen - hier sinkt die Hypro-A (LEE u. LLOYD, 1964; SJOERDSMA, UDENFRIEND, KEISER u. LeROY, 1964; LAITINEN, NIKKILÄ u. KIVIRIKKO, 1966), während das freie und peptidgebundene Hypro (DUBOVSKÝ, PACOVSKÝ u. DUBOVSKÁ, 1965; SJOERDSMA, UDENFRIEND, KEISER u. LeROY, 1964; LAITINEN, NIKKILÄ u. KIVIRIKKO, 1966), das unter physiologischen Bedingungen rasch ausgeschieden wird (PROCKOP, KEISER u. SJOERDSMA, 1962), und das CLP im Plasma (LeROY u. SJOERDSMA, 1965) ansteigen - ebenfalls auf eine enge Beziehung dieser beiden Parameter hin. Somit ist die Gesamtheit der bisher vorliegenden Befunde noch am sinnfälligsten dahingehend zu interpretieren, daß im CLP eine Zwischenstufe des Kollagenum- bzw. -abbaus vorliegt: ein Parameter also, der das Bindeglied in dem Kollagenstoffwechsel darstellt, das sich zwischen den Metabolismus vom Kollagenmolekül bis zu seinem Ausscheidungsprodukt, dem Hydroxyprolin, einfügt.

Bei der Betrachtung der gegenüber den Kontrollpersonen erniedrigten (73 %), teilweise aber auch im Normbereich (27 %) liegenden CLP-Werte bei

Sklerodermiepatienten fällt eine ähnliche Tendenz auf, wie sie auch wieder bei der Hypro-A bei dieser Krankheit zum Ausdruck kommt. Letztere ist nämlich bei Sklerodermiekranken im allgemeinen in der Norm liegend (RODNAN u. CAMMARATA, 1963; KORTING u. HOLZMANN, 1965; SMITH, RUKAVINA u. HAALAND, 1965).

Allerdings läßt sich dies nicht ohne weiteres mit den biochemischen Befunden an sklerodermisch veränderter Haut^{*)} in Einklang bringen. Sollte man

*) Die bisher angestellten biochemischen Untersuchungen der einzelnen Kollagenfraktionen in sklerodermisch veränderter Haut haben ein erniedrigtes Vorliegen des Gesamtkollagens ergeben. Die neutralsalzlösliche Fraktion ist gegenüber der Normalhaut um das Zehnfache vermehrt, während sich eine säurelösliche Fraktion nicht nachweisen läßt und das unlösliche Kollagen quantitativ unverändert vorliegt. Weiterhin zeigen elektronenoptische Untersuchungen des Kollagens bei der Sklerodermie eine größtenteils normale morphologische Struktur der Kollagenfibrille hinsichtlich Periodizität und Querstreifung sowie einen normalen Versilberungsmodus. Als wesentlicher Befund ist ein gehäuftes Vorkommen dünner Fibrillen als ultramorphologisches Substrat der Sklerosierung festzustellen. Auch deutet erhöhtes Vorkommen von Hexosamin und Hexosen im Serum von Sklerodermiekranken, besonders in der Initialphase, auf Veränderungen der Grundsubstanz bei dieser Krankheit hin, was auch der Auffassung von HAUSS, JUNGE-HÜLSING und KÖNIG entspricht, die eine Acceleration des Mucopolysaccharidstoffwechsels bei der Sklerodermie feststellen konnten. Auch MACHER und BREHLER weisen mittels Röntgeninterferenzuntersuchungen an hochgradig sklerodermisch veränderter Haut quantitative Abweichungen im Bereich der Grundsubstanz nach (weitere Einzelheiten bei KORTING u. HOLZMANN, 1967).

doch bei dem erhöhten Vorliegen der NLK-Fraktion (KORTING, HOLZMANN u. KÜHN, 1964) ebenfalls erhöhte CLP-Werte erwarten, also Bewegungen des Kollagenstoffwechsels, wie sie in ihrer Kontinuität bei der Einwirkung von Gestagenen und BAPN auf das Bindegewebe der Ratte deutlich werden. Dieser Tatbestand scheint jedoch hier nicht gegeben, was vielleicht durch den Umstand zu erklären ist, daß für den Abbau der NLK-Fraktion notwendige proteolytische Fermente nicht vorhanden sind bzw. nicht aktiviert werden können, wie dies z.B. durch histochemische Untersuchungen von STEIGLEDER, KAMEI und KUDICKE (1963) wahrscheinlich gemacht werden konnte.

Kommen wir nun auf die gelegentlich erhöhten Hypro-A-Werte bei Sklerodermiekranken zu sprechen, die anscheinend nur in der ödematösen Initialphase, offenbar einem Stadium mit besonders rapide vor sich gehendem Kollagenumbau (RODNAN u. CAMMARATA, 1963; KORTING u. HOLZMANN, 1965; SMITH, RUKAVINA u. HAALAND, 1965), beobachtet werden, so ist dieser selten zur Untersuchung gelangende Vorgang am ehesten der Stoffwechselsituation bei Verbrennungen vergleichbar. Es kommt nämlich in

der einer Verbrennung folgenden Resorptionsphase zu einer Vermehrung der Hypro-A (KLEIN, DAVIS u. CURTISS, 1962; KLEIN u. DAVIS, 1964; RAAB, 1966). Hier lassen sich also im Sinne eines beschleunigten Kollagenumbaus und Stoffwechsels in einer Phase noch gesteigerter Fermentaktivität im Bindegewebe auch zwanglos die erhöhten Hypro-A-Werte erklären.

Der regelmäßig unter Gestageneinwirkung bei Sklerodermiepatienten zu beobachtenden CLP-Erhöhung (Beobachtungsgut: bisher 5 Sklerodermiepatienten) ist die bereits nachgewiesene Steigerung von proteolytischen Fermenten wie Kathepsinen und Leucinaminopeptidase, wie auch der gesteigerte Abbau der NLK-Fraktionen nach Gaben von Progesteron (KÜHN, STECHER, IWANGOFF, HAMMERSTEIN, DURRUTI, HOLZMANN u. KORTING, 1965) an die Seite zu stellen. Eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch diese Substanzen äußert sich schließlich auch in einer Steigerung der Hypro-A von Sklerodermiekranken (HOLZMANN, KORTING u. MORSCHES, 1965).

Das nach Gestagengaben gesteigerte CLP bei dieser Kollagenkrankheit stellt also auch hier den noch

fehlenden Parameter bzw. die fehlende Zwischenstufe des Kollagenum- bzw. -abbaus zwischen dem Gewebs-Mesenchym und dem peptidgebundenen Hydroxyprolin als Endprodukt des Kollagenstoffwechsels im Urin dar. Mithin sind diese Befunde ein weiterer Beweis für die biochemisch sinnvolle Einwirkung der Gestagene in den veränderten Bindegewebsstoffwechsel der Sklerodermiepatienten, ein Tatbestand, den die klinische Erfahrung bestätigt.

VII. Zusammenfassung

Es wurden CLP-Bestimmungen im Serum von unbehandelten - auch in Abhängigkeit vom Alter - und mit bindegewebswirksamen Substanzen (β -Aminopropionitril, Corticosteroid, Gestagen und Penicillamin) behandelten Ratten durchgeführt. Weiterhin wurde CLP im Serum des Menschen, gleichfalls in Abhängigkeit vom Alter, sowie bei Sklerodermiekranken vor und nach Therapie mit Gestagen bestimmt.

Es ergab sich auf Grund dieser Untersuchungen, daß das CLP mit zunehmendem Alter abnimmt. Diese Abnahme ist bei den Ratten signifikant. Beim Menschen ist nach anfänglich signifikantem CLP-Anstieg vom Nabelschnurblut zum Kollektiv der 21-30jährigen ein signifikanter CLP-Abfall zum Kollektiv der 31-40jährigen zu erfassen. Ein weiterer, jedoch nur graphisch zu erfassender CLP-Abfall folgt im Kollektiv der 51-60jährigen. Nach Verabreichung der oben genannten Substanzen an Ratten ergab sich bei β -Aminopropionitril und Gestagen ein signifikanter CLP-Anstieg, während bei Penicillamin das CLP signifikant und bei Corticosteroid statistisch

auffällig abfiel. Weiterhin zeigten sich bei Sklerodermiekranken im Vergleich zu Kontrollpersonen unter der Norm bzw. in der Norm liegende CLP-Werte, die unter Gestagentherapie anstiegen.

Diese hier im einzelnen angeführten quantitativen Bewegungen des CLP im Serum

- a) für Alter bei Ratte und Mensch,
- b) nach Applikation von β -Aminopropionitril, Corticosteroid, Gestagen und Penicillamin bei der Ratte,
- c) für Sklerodermiekranken vor und während Therapie mit Gestagenen,

sind weitgehend den aus der Literatur bekannten Veränderungen der NLK-Fraktion im Bindegewebe einerseits und der Hypro-A andererseits korreliert. Die Gesamtheit der bisher vorliegenden Befunde ist somit am sinnfälligsten dahingehend zu interpretieren, daß im CLP eine Zwischenstufe des Kollagenum- bzw. -abbaus vorliegt. Das CLP würde hiermit einen Parameter darstellen, der sich als Bindeglied zwischen den Metabolismus des Kollagenmoleküls und seinem Ausscheidungsprodukt, dem Hydroxyprolin,

einfügt. Damit liegt es nahe, der Hypro-A und dem CLP einen gemeinsamen Pool zugrunde zu legen.

F = 103,9
p ≤ 0,01

	yy	xx	xy	b	b ²	yy'	yy''	df	MAQ
Innerhalb:	76,9	2871,9	-152,6	-0,05	0,003	8,3	68,4	84	0,81
Zwischen:	433,9	3461,4	211,3	0,06	0,004	12,8	421,0	5	84,2
Total:	510,8	6333,2	58,78	0,009	0,00008	0,51	510,3	89	5,7

Tab. 6 Aufzeichnung der Ergebnisse der Kovarianzanalyse zwischen dem Anfangsgewicht (x) und dem CLP-Gehalt (µg Hydro/ml Serum) des Rattenurums

$$x = \text{Kovariablen (Anfangsgewicht)}$$

$$y = \text{Variable (Endgewicht)}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$b = -\frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$yy' = b^2 \cdot xx$$

$$yy'' = yy - yy'$$

$$MAQ = -\frac{yy''}{df} = \text{mittleres Abweichungsquadrat}$$

$$F = -\frac{MAQ_2}{MAQ_1}$$

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	98,0	144,0	46,0	12,6
2	100,0	145,0	45,0	13,2
3	95,0	137,0	42,0	14,2
4	105,0	150,0	45,0	12,8
5	110,0	157,0	47,0	13,2
6	116,0	163,0	47,0	13,1
7	102,0	148,0	46,0	13,0
8	100,0	147,0	47,0	12,2
9	108,0	155,0	47,0	12,8
10	99,0	142,0	43,0	11,9
11	111,0	159,0	48,0	12,7
12	108,0	153,0	45,0	13,2
13	100,0	145,0	45,0	13,1
14	110,0	161,0	51,0	13,5
15	103,0	150,0	47,0	12,9
$\bar{x}$	144,3	150,4	46,1	12,96
s	$\pm 5,9$	$\pm 7,5$	$\pm 2,1$	$\pm 0,53$
$s_{\bar{x}}$	1,3	1,9	0,5	0,15

Tab. 8 a **Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des Serums
der BAPN-Ratten**
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

^{*)} Gewichtsangaben in Gramm

^{**)} Angabe des CLP in μg Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	82,5	99,5	17,0	10,1
2	91,0	111,0	20,0	11,0
3	82,0	95,0	13,0	9,5
4	96,0	120,0	24,0	10,3
5	91,0	111,5	20,5	10,7
6	76,0	99,5	23,5	10,9
7	81,0	100,0	19,0	9,7
8	80,0	99,0	19,0	10,8
9	89,0	110,0	21,0	10,6
10	95,0	109,0	14,0	10,2
11	79,0	101,0	22,0	10,8
12	92,0	111,0	19,0	9,5
13	90,0	112,0	22,0	10,1
14	97,0	120,0	23,0	10,1
15	90,0	113,0	23,0	10,9
$\bar{x}$	87,4	107,4	20,0	10,36
s	$\pm 6,7$	$\pm 7,9$	$\pm 3,3$	$\pm 0,17$
$s_{\bar{x}}$	1,7	2,0	0,9	0,04

Tab. 8 b Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des Serums
der Corticosteroid-Ratten
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

*) Gewichtsangaben in Gramm

**) Angabe des CLP in μg Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	83,0	123,0	40,0	12,2
2	80,0	124,0	44,0	12,3
3	80,0	127,0	47,0	12,3
4	85,0	131,0	46,0	11,4
5	94,0	141,0	48,0	11,0
6	87,0	128,0	41,0	11,7
7	88,0	129,0	41,0	11,6
8	93,0	129,0	36,0	11,0
9	95,0	145,0	50,0	10,9
10	80,0	126,0	46,0	11,1
11	90,0	134,0	44,0	11,0
12	91,0	144,0	55,0	10,8
13	84,0	144,0	40,0	10,5
14	89,0	134,0	45,0	11,1
15	88,0	133,0	45,0	11,9
$\bar{x}$	87,1	132,8	45,7	11,39
s	$\pm 4,9$	$\pm 7,5$	$\pm 5,7$	$\pm 0,58$
$s_{\bar{x}}$	1,3	1,4	1,5	0,15

Tab. 8 c Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des Serums
der Norethisteronacetat-Ratten
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

*) Gewichtsangaben in Gramm

**) Angabe des CLP in μg Hypo/ml Serum

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	97,0	130,0	33,0	13,0
2	92,0	127,0	35,0	12,8
3	105,0	130,5	25,5	12,7
4	105,0	143,0	38,0	12,0
5	103,0	148,0	45,4	11,9
6	93,0	133,0	49,0	13,1
7	93,0	137,5	44,5	12,3
8	93,0	131,0	38,0	11,0
9	97,0	151,2	54,2	11,0
10	97,0	134,0	37,0	11,8
11	97,0	133,0	36,0	11,9
12	105,0	129,5	24,5	12,0
13	105,0	151,4	46,4	10,8
14	105,0	137,0	32,0	12,1
15	100,0	136,5	36,5	12,6
$\bar{x}$	99,1	136,9	35,7	12,07
s	$\pm 5,1$	$\pm 8,1$	$\pm 7,6$	$\pm 0,72$
$s_{\bar{x}}$	1,3	2,1	2,6	0,19

Tab. 8 d Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des
Serums der Progesteron-Ratten
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

*) Gewichtsangaben in Gramm

**) Angabe des CLP in μg Hypo/ml Serum

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	99,0	138,5	39,5	7,6
2	100,0	126,5	26,5	6,9
3	100,0	132,4	32,4	6,6
4	95,0	144,0	49,0	5,9
5	92,0	122,4	30,4	7,5
6	93,0	128,6	35,6	7,8
7	107,0	127,0	20,0	5,0
8	107,0	145,5	38,5	3,0
9	104,0	148,5	44,5	1,8
10	88,0	124,0	36,0	6,0
11	87,0	130,0	43,0	7,1
12	88,0	134,0	46,0	5,9
13	98,0	136,5	38,5	4,8
14	98,0	134,0	36,0	7,7
15	98,0	144,5	46,5	8,0
$\bar{x}$	96,9	134,4	37,5	6,11
s	$\pm 6,4$	$\pm 8,3$	$\pm 7,9$	$\pm 1,76$
$s_{\bar{x}}$	1,7	2,1	2,1	0,45

Tab. 8 e Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des
Serums der Penicillamin-Ratten
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

^{*)} Gewichtsangaben in Gramm

^{**)} Angabe des CLP in μ g Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	Anfangs- ^{*)} gewicht	End- ^{*)} gewicht	Differenz ^{*)} Eg - Ag	CLP ^{**)}
1	87,0	117,5	30,5	12,0
2	88,0	119,0	31,0	12,2
3	87,0	133,0	46,0	11,5
4	98,0	137,0	39,0	10,0
5	97,0	134,0	37,0	11,3
6	90,0	120,0	30,0	12,0
7	98,0	124,5	26,5	11,5
8	88,0	127,5	39,5	10,5
9	88,0	114,0	26,0	13,1
10	87,0	136,0	49,0	9,8
11	101,0	142,5	41,5	10,0
12	101,0	137,0	36,0	10,5
13	101,0	138,0	37,0	10,7
14	93,0	133,0	40,0	11,0
15	94,0	130,0	36,0	11,0
$\bar{x}$	93,2	129,5	36,3	11,14
s	$\pm$ 5,7	$\pm$ 8,7	$\pm$ 6,7	$\pm$ 0,93
$s_{\bar{x}}$	1,5	2,2	1,7	0,24

Tab. 8 f Anfangs- und Endgewicht, Differenz Anfangs-
minus Endgewicht sowie CLP-Gehalt des
Serums der Kontrollgruppe
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung
und Standardabweichung vom Mittelwert

*) Gewichtsangaben in Gramm

**) Angabe des CLP in μ g Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	Alter	Geschlecht	CLP	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	23 J.	♂	8,5	9,2	$\pm 1,2$	0,46
2	24 J.	♂	8,7			
3	25 J.	♂	10,2			
4	25 J.	♂	8,0			
5	27 J.	♂	10,7			
6	32 J.	♀	8,0	7,9	$\pm 1,3$	0,53
7	34 J.	♂	6,0			
8	37 J.	♀	7,6			
9	40 J.	♀	9,7			
10	40 J.	♂	8,3			
11	42 J.	♂	9,2	8,1	$\pm 1,1$	0,40
12	46 J.	♂	7,0			
13	47 J.	♀	8,0			
14	54 J.	♀	5,0	4,3	$\pm 0,9$	0,69
15	55 J.	♂	3,6			
<u>Gesamt:</u>				7,9	$\pm 1,2$	0,34

Tab. 9 a Alter, Geschlecht und CLP^{*)}-Gehalt im Serum von Kontrollpersonen
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung vom Mittelwert

Lfd.Nr.	Alter	Geschlecht	CLP	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	0 J.	+	8,4	6,98	$\pm 1,08$	0,34
2	0 J.	♂	6,0			
3	0 J.	♂	7,9			
4	0 J.	♀	7,5			
5	0 J.	♂	8,0			
6	0 J.	♀	6,5			
7	0 J.	♀	7,1			
8	0 J.	♂	7,4			
9	0 J.	♂	6,0			
10	0 J.	♂	5,0			

Tab. 9 b Alter, Geschlecht und CLP^{*)}-Gehalt im Serum von Kontrollpersonen (Neugeborene).
Errechneter Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung vom Mittelwert

^{*)} Angabe des CLP in μg Hypo/ml Serum

Lfd.Nr.	Alter	Geschlecht	CLP	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	71 J.	♀	3,0			
2	63 J.	♀	5,0			
3	47 J.	♂	4,4			
4	45 J.	♀	3,2			
5	61 J.	♀	1,3			
6	67 J.	♀	6,5			
7	54 J.	♀	5,1			
8	60 J.	♀	6,9	4,0	$\pm 2,1$	0,54
9	53 J.	♀	7,6			
10	29 J.	♀	5,9			
11	14 J.	♀	2,8			
12	67 J.	♀	3,3			
13	46 J.	♂	2,1			
14	25 J.	♀	1,2			
15	34 J.	♂	1,7			

Tab. 10 a Alter, Geschlecht und CLP *)-Gehalt im Serum der Sklerodermiepatienten
Errechner Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung vom Mittelwert

*) CLP wurde angegeben in μg Hypo/ml Serum

Lfd.Nr.	CLP ^{*)}	Rangzahl der Kontrollpersonen	Rangzahl der Sklerodermiepatienten
1	10,7 (K)	1	
2	10,2 (K)	2	
3	9,7 (K)	3	
4	9,2 (K)	4	
5	8,7 (K)	5	
6	8,5 (K)	6	
7	8,3 (K)	7	
8	8,0 (K)	8	
9	8,0 (K)	9	
10	8,0 (K)	10	
11	7,6 (K)	11,5	
12	7,6 (S)		11,5
13	7,0 (K)	13	
14	6,9 (S)		14
15	6,5 (S)		15
16	6,0 (K)	16	
17	5,9 (S)		17
18	5,1 (S)		18
19	5,0 (K)	19,5	
20	5,0 (S)		19,5
21	4,4 (S)		21
22	3,6 (K)	22	
23	3,3 (S)		23
24	3,2 (S)		24
25	3,0 (S)		25
26	2,8 (S)		26
27	2,1 (S)		27
28	1,7 (S)		28
29	1,3 (S)		29
30	1,2 (S)		30
Summe der Rangzahlen:		137,0	328,0
Signifikanz:		$P \leq 0,01$	$P \leq 1 \%$

(K) Kontrollpersonen

(S) Sklerodermiepatienten

Tab. 10 b Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
Vergleich der CLP-Werte der Sklerodermie-
patienten mit denen der Kontrollpersonen

*) Angabe des CLP in μg Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	CLP ^{*)}	Rangzahl der Kontrollpersonen	Rangzahl der Sklerodermiepatienten
1	10,7 (K)	1	
2	9,7 (K)	2	
3	9,2 (K)	3	
4	8,3 (K)	4	
5	8,0 (K)	5	
6	8,0 (K)	6	
7	7,6 (K)	7,5	
8	7,6 (S)		7,5
9	7,0 (K)	9	
10	6,9 (S)		10
11	6,0 (K)	11	
12	5,9 (S)		12
13	5,1 (S)		13
14	5,0 (K)	14,5	
15	5,0 (S)		14,5
16	4,4 (S)		16
17	3,6 (K)	17	
18	3,2 (S)		18
19	2,1 (S)		19
20	1,7 (S)		20
21	1,3 (S)		21
22	1,2 (S)		22
Summe der Rangzahlen:		80,0	173,0
Signifikanz:		$P \leq 0,01$	$P \leq 1 \%$

(K) Kontrollpersonen

(S) Sklerodermiepatienten

Tab. 10 c Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
Vergleich der CLP-Werte gleichaltriger
Kontrollpersonen und Sklerodermiepatienten

^{*)} Angabe des CLP in μg Hypro/ml Serum

Lfd.Nr.	Patient *)	CLP-Werte zu Beginn der Therapie	1	nach 2 3 Wochen	4	2	nach 3 4 Monaten	5
1	● (1)	3,0	7,4	10,2	13,1			
2	x (2)	5,0	8,9			9,5		9,0
3	○ (3)	4,4		10,8	14,2	12,0		
4	● (4)	3,2			8,5	8,7	8,0	
5	● (15)	1,7					8,0	11,2

Tab. 11 CLP-Werte von Sklerodermiepatienten vor und nach Therapie mit Gestagen

IX. Literaturverzeichnis

1. ANDERSON, J., and D.W. BANNISTER: Total urinary hydroxyproline excretion in normal human subjects.
Clin.Sci. 29, 583-587 (1965)
2. BAUMANN, H., E. FRITZE u. C. KALLWEIT: Der Hydroxyprolinegehalt des Blutserums bei Gesunden und bei Silikosekranken.
Klin.Wschr. 42, 786-788 (1964)
3. BENOIT, F.L., G.B. THEIL and R.H. WATTEN:
Hydroxyproline excretion in endocrine disease.
Metabolism 12, 1072-1082 (1963)
4. BOLOGNANI, L., and I.V. PONSETTI: C^{45} uptake in fracture callus of normal and aminoacetonitril-treated rats.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 109, 133-135 (1962)
5. BUDDECKE, C., u. E. RUFF-LICHTENSTEIN: Anionische Polysaccharide und Glykoproteide des menschlichen Lungengewebes in Abhängigkeit vom Lebensalter und bei Silikose.
Beitr. Silikose-Forsch., S-Bd. Grundfragen Silikoseforsch. 5, 173-188 (1963)
6. BUKHANOVA, A.I.: Cyto-histochemical changes taking place in experimental wounds under influence of various adrenal-cortex hormones.
Dokl.Akad.Nauk.SSSR 144, 1406-1409 (1962)

7. CADAVID, N.G., B. DENDUCHIS and R.E. MANCINI:
Soluble collagens in normal rat
skin, from embryo to adulthood.
Lab.Invest. 12, 598-605 (1963)
8. CHARVÁT, J., V. PACOVSKÝ u. J. DUBOVSKÝ: Bei-
träge zum Problem der diffusen
Knochenerkrankungen.
Wien.Z.Inn.Med. 45, 81-94 (1964)
9. CURTIS, P.H.: Diskussionsbeitrag zu: The Russel
A. Hibbs Society.
J. Bone Surg. 45 A, 439 (1963)
10. DASLER, W., R.E. STONER and R.V. MILLISER:
Effect of osteolathyrisism on soluble
collagen fractions of rat connective
tissue.
Metabolism 10, 883-887 (1961)
11. DICKSON, D.D., J.D. CAMP and R.K. GHORMLEY:
Osteitis deformans; Paget's disease
of bone.
Radiology 44, 449-470 (1945)
12. DULL, T.A., and P.H. HENNEMAN: Urinary hydroxy-
proline as an index of collagen
turnover in bone.
New Engl.J.Med. 268, 132-134 (1963)
13. DUBOVSKÝ, J., V. PACOVSKÝ and E. DUBOVSKÁ:
Plasma hydroxyproline and proline
in primary hyperparathyreodism
and chronic uremia.
Clin.chim.Acta 12, 230-232 (1965)

14. EFRON, M.L., E.M. BIXBY, L.G. PALATTAO and C.V. PRYLES: Hydroxyprolinemia associated with mental deficiency. *New Engl.J.Med.* 267, 1193-1194 (1962)
15. EFRON, M.L., E.M. BIXBY, L.G. PALATTAO and C.V. PRYLES: Hydroxyprolinemia associated with mental deficiency. *New Engl.J.Med.* 272, 1299-1309 (1965)
16. EMMRICH, R.: Chronische Krankheiten des Bindegewebes.
Thieme, Leipzig 1959, S. 128
17. FRANKLAND, D.M., and C.H. WYNN: The collagenolytic activity of rat liver lysosomes. *Biochem.J.* 84, 20-23 (1962)
18. FREY, J.: Etude d'une méthode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du sérum. *Biochim.Biophys.Acta* 111, 440-446 (1965)
19. FREY, J., NGUON HOA, J. GRAS, J.C. HENRY and Y. GUDEFIN: Immunelectrophoresis reveals. Collagen solubility in human serum. *Science* 150, 751-754 (1965)
20. GERBER, G.B., G. GERBER and K.I. ALTMAN: Studies on the metabolism of tissue proteins. I. Turnover of collagen labelled with Proline-U-C¹⁴ in young rats. *J.biol.Chem.* 235, 2653-2656 (1960)

21. GOIDNACH, I.F., L. LENZI and E. SILVA: Urinary hydroxyproline excretion in normal subjects and in patients affected with primary disease of bone.
Clin.Chim.Acta 11, 35-38 (1965)

22. GOULD, B.S., G. MANNER, H.M. GOLDMAN and J.M. STOLMAN: Some aspects of collagen formation.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 85, 385-398 (1960)

23. GRASSMANN, W., J. ENGEL, K. HANNIG, H. HÖRMANN, K. KÜHN und A. NORDWIG: Kollagen.
Fortschr.chem.org.Naturst. 23, 195-314 (1965)

24. GRIES, G., und J. LINDER: Untersuchungen über den Kollagenstoffwechsel bei akuten Entzündungen.
Z.Rheumaforsch. 20, 122-125 (1960)

25. GRIES, G., und L. LINDER: Zur Frage des Kollagenabbaus bei verschiedenen Formen experimenteller Entzündungen.
Z.Rheumaforsch. 22, 439-441 (1963)

26. GROSS, J.: Studies on the formation of collagen.
II. The influence of growth rate on neutral salt extracts of Guinea pig dermis.
J.exp.Med. 107, 265-277 (1958)

27. GÜNTHER, T., und P.M. CARSTEN: Über die Löslichkeit von Kollagen in Abhängigkeit von Nebennierenrindenhormonen.
Naturwissenschaften 48, 699-702 (1961)

28. HARKNESS, R.D., A.R. MARKO, H.M. MUIR and
A. NEUBERGER: The metabolism
of collagen and other proteins
of the skin of rabbits.
Biochem.J. 56, 558-569 (1954)
29. HAUSS, W.H., G. JUNGE-HÜLSING und F. KÖNIG:
Über das Vorkommen von Veränderun-
gen des Mucopolysaccharidstoff-
wechsels in der Klinik. I. Klini-
sche Beobachtungen zur unspezifi-
schen Mesenchymreaktion.
Med.Welt 2371-2377 (1962)
30. HAUSS, W.H., G. JUNGE-HÜLSING und F. KÖNIG:
Über das Vorkommen von Veränderun-
gen des Mucopolysaccharidstoff-
wechsels in der Klinik. II. Klini-
sche Beobachtungen zur unspezifi-
schen Mesenchymreaktion bei
Arteriosklerose, insbesondere bei
Herzinfarkt.
Med. Welt 125-132 (1963)
31. HARTMANN, F.: Die Hydroxyprolinausscheidung im
Urin bei Normalpersonen und
Patienten mit rheumatischen Er-
krankungen.
Klin.Wschr. 44, 1053-1058 (1966)
32. HOLZMANN, H., G.W. KORTING, F. HAMMERSTEIN,
K.H. STECHER, M. DURRUTI,
P. IWANGOFF und K. KÜHN: Quantita-
tive Bestimmungen der einzelnen
Kollagenfraktionen der Haut nach
Anwendung von Resochin und Pro-
gesteron.
Naturwissenschaften 51, 310-311 (1964)

33. HOLZMANN, H., G.W. KORTING und B. MORSCHES:
Kathepsinbestimmung im Serum
bei lathyritischen und mit
Prednison behandelten lathyriti-
schen Ratten.
Naturwissenschaften 52, 308-309
(1965 a)
34. HOLZMANN, H., G.W. KORTING und B. MORSCHES:
Zur Therapie der Sklerodermie
mit Gestagenen.
Hautarzt 16, 456-458 (1965 b)
35. HOLZMANN, H., B. MORSCHES und G.W. KORTING:
Kathepsinbestimmung im Serum von
Ratten nach Gaben von Progesteron
sowie Progesteron und Prednison.
Z.ges.exp.Med. 139, 810-813 (1965)
36. HOSLEY, H.F., and E. TAFT: Hydroxyproline
excretion in cancer.
Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 6,
30-33 (1965)
37. HOSLEY, H.F., E. TAFT, K.B. OLSON, S. GATES and
R.T. BEEBE: Hydroxyproline
excretion in malignant neoplastic
disease.
Arch.Int.Med. 118, 565-571 (1966)
38. HOUCK, J.C.: The effect of cortisol and salicylate
upon connective tissue.
Amer.J.Path. 41, 365-371 (1962)

39. HOUCK, J.C., and R.A. JACOB: Connective tissue.
VII. Factors inhibiting the dermal
chemical response to cortisol.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 113,
692-696 (1963)
40. ITO, T.: Biochemical studies on the connective
tissue. 2. Effect of cortisone
acetate on the connective tissue.
Kumamoto Med.J. 17, 79-89 (1964)
41. JASIN, H.E., and M. ZIFF: Relationship between
soluble collagen and urinary
hydroxyproline in the lathyrtic
rat.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 110,
837-841 (1962)
42. JASIN, H.E., C.W. FINK, W. WISE and M. ZIFF:
Relationship between urinary
hydroxyproline and growth.
J.clin.Invest. 41, 1928-1935
(1962)
43. JONES, C.R., M.W. BERGMANN, P.J. KITTNER and
W.W. PIGMAN: Urinary hydroxyproline
excretion in normal children and
adolescents.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 115,
85-87 (1964)
44. KEISER, H., E.C. LeROY, S. UDENFRIEND and
A. SJOERDSMA: Collagen-like
protein in human plasma.
Science 142, 1678-1679 (1963)

45. KEISER, H., J.R. GILL, jr., A. SJOERDSMA and F.C. BARTTER: Relation between urinary hydroxyproline and parathyroid function. J.clin.Invest. 43, 1073-1082 (1964)
46. KIBRICK, A.C., C.Q. HASHIRO and L.B. SAFIER: Hydroxyproline peptides of urine in arthritic patients and controls in a collagen-free diet. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 109, 473-478 (1962)
47. KIVIRIKKO, K.I., M. KOIVUSALO, O. LAITINEN and B.-A. LAMBERG: Hydroxyproline in the serum and urine of patients with hyperthyroidism. J.clin.Endocrinol.Metab. 24, 222-223 (1964 a)
48. KIVIRIKKO, K.I., M. KOIVUSALO, O. LAITINEN and B.-A. LAMBERG: Hydroxyproline in the serum and urine. Normal values and clinical significance. Acta med.Scand. 179, 275-277 (1964 b)
49. KIVIRIKKO, K.I., and O. LAITINEN: Effect of cortisone on the serum and urine of young rats. Acta Physiol.Scand. 64, 356-360 (1965)

50. KIVIRIKKO, K.I., O. LAITINEN and B.-A. LAMBERG:
Values of urine and serum
hydroxyproline in the diagnosis
of thyroid disease.
J.clin.Endocrin.Metab. 25,
1347-1352 (1965)
51. KIVIRIKKO, K.I., O. LAITINEN, J. AER and J. HALME:
Studies with ^{14}C -proline on the
action of cortisone on the
metabolism of collagen in the rat.
Biochem.Pharmacol. 14, 1445-1451
(1965)
52. KLEIN, L., P.H. CURTISS, jr., and J.H. DAVIS:
Collagen breakdown in thermal burns.
Surg.Forum 13, 459-461 (1962)
53. KLEIN, L., and J.H. DAVIS: Correlation of urinary
hydroxyproline to severity of burn.
Surg.Forum 15, 465-467 (1964)
54. KLEIN, L., K. ALBERTSEN and P.H. CURTISS:
Urinary hydroxyproline in
hyperparathyroidism: a study of
three cases with and without bone
lesions.
Metabolism 11, 1023-1027 (1965)
55. KOLLER, S.: Statistische Auswertungsmethoden,
in: Rauen, "Biochemisches Taschen-
buch".
Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964,
II, 2. Aufl.

56. KORTING, G.W., und H. HOLZMANN: Zur Hydroxyprolin-
ausscheidung im Harn von Hautkranken.
Klin.Wschr. 43, 361-364 (1965)
57. KORTING, G.W., H. HOLZMANN und K. KÜHN: Biochemische
Bindegewebsanalysen bei progressiver
Sklerodermie.
Klin.Wschr. 42, 247-248 (1964)
58. KORTING, G.W., und H. HOLZMANN: Die Sklerodermie
und ihr nahestehende Bindegewebs-
probleme.
Thieme, Stuttgart 1967
59. KOWALEWSKI, K.: Urinary excretion of hydroxyproline
in rats treated with growth
hormone and anabolic steroid.
Exp.Med. International Congress
series No. 99, 1965
60. KÜHN, K.: Der Stoffwechsel des Kollagens unter
Einfluß von β -Aminopropionitril
und Prednison.
Beitr.Silikose-Forsch. 6, 167-175
(1965)
61. KÜHN, K., M. DURRUTI, P. IWANGOFF, F. HAMMERSTEIN,
K.H. STECHER, H. HOLZMANN und
G.W. KORTING: Untersuchungen über
den Stoffwechsel des Kollagens.
I. Der Einbau von $^{14}\text{-C}$ -Glycin in
Kollagen bei lathyritischen Ratten.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 336,
4-12 (1964)

62. KÜHN, K., H. HOLZMANN und G.W. KORTING:
Quantitative Bestimmungen der
löslichen Kollagenvorstufen
nach Anwendung einiger Binde-
gewebstherapeutika.
Naturwissenschaften 49, 134-135
(1962)
63. KÜHN, K., P. IWANGOFF, F. HAMMERSTEIN, K. STECHER,
M. DURRUTI, H. HOLZMANN und
G.W. KORTING: Untersuchungen über
den Stoffwechsel des Kollagens.
II. Der Einbau von ¹⁴C-Glycin
in Kollagen bei mit Prednison be-
handelten Ratten.
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 337,
249-256 (1964)
64. KÜHN, K., K. STECHER, P. IWANGOFF, F. HAMMERSTEIN,
M. DURRUTI, H. HOLZMANN und
G.W. KORTING: Studies on the
metabolism of collagen. III. The
incorporation of ¹⁴C-glycin into
the collagen of rats treated with
progesterone.
Biochem.Z. 343, 528-536 (1965)
65. KÜHN, K., G. SCHUPPLER und J. KÜHN: Veränderungen
im Verhalten des Kollagens mit
zunehmender Reinigung und nach Be-
handlung mit proteolytischen
Enzymen.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 338,
10-31 (1964)

66. LAITINEN, O., E.A. NIKKILÄ and K.I. KIVIRIKKO:
Hydroxyproline in the serum and
urine.
Acta med.Scand. 179, 275-284 (1966)
67. LANGNESS, U., und H. BEHNKE: Die Hydroxyprolin-
ausscheidung im Urin bei
Osteogenesis imperfecta.
Klin.Wschr. 44, 1294-1297 (1966)
68. LEE, C.A., and H.M. LLOYD: Urinary hydroxyproline
in diseases involving bone and
calcium metabolism.
Med.J.Australia 1, 992-995 (1964)
69. LENZI, F., G. RAVENNI, M. RUBEGNI e L. DEL GIOVANE:
The significance of urinary
hydroxyproline in osteoporosis.
Panminerva Med. 53, 2935-2939
(1962)
70. LeROY, E.C., P. CARBONE and A. SJOERDSMA:
Elevated plasma levels of a
hydroxyproline-containing protein
in Hodgkin's disease and their
relation to disease activity.
J.Lab.clin.Med. 67, 891-897 (1966)
71. LeROY, E.C., A. KAPLAN, S. UDENFRIEND and
A. SJOERDSMA: A hydroxyproline-
containing collagen-like protein
in plasma and a procedure for its
assay.
J.biol.Chem. 239, 3350-3356 (1964)

72. LeROY, E.C., and A. SJOERDSMA: Clinical significance of a hydroxyproline-containing protein in human plasma. J.clin.Invest. 44, 914-919 (1965)
73. LeROY, E.C., and S.M. WOLFF: Variations in plasma levels of a hydroxyproline-containing protein with fever and inflammation in man. Arthritis Rheumatism 9, 281-287 (1966)
74. LEVENE, C.I., and J. GROSS: Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos treated with β -Aminopropionitril. J.exp.Med. 110, 771-790 (1959)
75. LI, C.C.: Introduction to experimental statistics. New York, San Francisco: McGraw-Hill Book Company, 1964
76. LINDER, A.: Statistische Methoden, 3. Aufl., Bd. 3. Birkhäuser-Verlag, Basel 1960
77. LINDSTEDT, S., and D.J. PROCKOP: Isotopic studies on urinary hydroxyproline as evidence for rapidly catabolized forms of collagen in the young rat. J.biol.Chem. 236, 1399-1403 (1961)
78. MACHER, E., und B. BREHLER: Röntgeninterferenzuntersuchungen bei Sklerodermia diffusa und circumscripta. Hautarzt 9, 409-414 (1958)

79. MANNER, G., and B.S. GOULD: Action of hydrocortisone on the distribution and collagen-forming activity of chick embryo polysomes.
Dept.Biol., Mass.Inst.Technol.,
Cambridge 1965, p. 359
80. MARTIN, G.R., S.G. MERGENHAGEN and D.J. PROCKOP:
Influence of scurvy and lathyrism (ordoratism) on hydroxyproline excretion.
Nature (London) 191, 1008-1009
(1961)
81. MEILMAN, E., M.M. URIVETZKY and C.M. RAPOPORT:
Urinary hydroxyproline peptides.
J.clin.Invest. 42, 40-50 (1963)
82. MIKKONEN, L., T. TUOMINEN und E. KULONEN:
Collagen fractions in lathyritic rats.
Biochem.Pharmacol. 3, 181-183
(1960)
83. MORSCHES, B., H. HOLZMANN, G.W. KORTING und
M. BRAUN: Zum Einfluß von bindegewebswirksamen Substanzen (β -Aminopropionitril, Progesteron und Chloroquin) auf den Leucin-Amino-peptidase-Gehalt im Ratten-serum.
Arzneimittel-Forsch. 16, 1081-1082
(1966)

84. NAKAGAWA, M., and T. TAMAKI: Urinary hydroxyproline
in orthopedic diseases.
Nogoya J.Med.Sci. 27, 228-234 (1965)
85. NIMNI, M.E.: Accumulation of a collagen precursor
in the skin of penicillamine-
treated rats.
Biochem.Biophys.Acta 111, 576-579
(1965)
86. NIMNI, M.E., and L.A. BAVETTA: Collagen defect
induced by penicillamine.
Science 150, 905-907 (1965)
87. ORBISON, J.L., C. McCRARY and M. CALLAHAN: Urinary
excretion and serum composition of
lathyrctic rats.
Arch.Pathol. 79, 292-298 (1965)
88. PLATT, W.D., L.H. DOOLITTLE and J.W.S. HARTSHORN:
Urinary hydroxyproline in metastatic
cancer of bone.
New Engl.J.Med. 271, 287-290 (1964)
89. PROCKOP, D.J.: Isotopic studies on collagen
degradation and the urine
excretion of hydroxyproline.
J.clin.Invest. 43, 453-460 (1964)
90. PROCKOP, D.J., H. KEISER and A. SJOERDSMA:
Gastrointestinal resorption and renal
excretion of hydroxyproline-peptides.
Lancet 2, 527-528 (1962)

91. PROCKOP, D.J., and A. SJOERDSMA: Significance of urinary hydroxyproline in man.
J.clin.Invest. 40, 843-849 (1961)
92. PROCKOP, D.J., and S. UDENFRIEND: A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine.
Anal.Biochem. 1, 228-239 (1960)
93. RAAB, W.: Experimentelle Untersuchungen zur Hydroxyprolinausscheidung nach Verbrennungen.
Arch.klin.exp.Derm. 226, 178-181 (1966)
94. RAVENNI, G., M. RUBEGNI and L. DEL GIOVANE: Hydroxyprolinuria in normal persons.
Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 38, 263-266 (1962 a)
95. RAVENNI, G., M. RUBEGNI and L. DEL GIOVANE: Hydroxyprolinuria in osteoporosis.
Boll. Soc.Ital.Biol.Sper. 38, 266-267 (1962 b)
96. RODNAN, G.-P., and R.J. CAMMARATA: Urinary excretion of hydroxyproline in progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma).
Clin.Res. 11, 179-180 (1963)
97. ROSENKRANTZ, J.A., J. WOLF and J.J. KAICHER: Paget's disease (Osteitis deformans).
Arch.intern.Med. 90, 610-633 (1952)

98. RUBEGNI, M., G. RAVENNI and L. DEL GIOVANE:
Increased excretion of urinary
hydroxyproline in osteolytic
processes.
Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 38, 877-878
(1962)
99. SIUKO, H., J. SÄVELÄ and E. KULONEN: Effect of
hydrocortisone on the formation of
collagen in guinea pig skin.
Acta Endocrin. (Khb.) 31, 113-116
(1959)
100. SJOERDSMA, A., S. UDENFRIEND, H. KEISER and
E.C. LeROY: Hydroxyproline and
collagen metabolism.
Ann.Intern.Med. 63, 672-694 (1964)
101. SMILEY, J.D., and M. ZIFF: Urinary hydroxyproline
excretion and growth.
Physiol.Rev. 44, 30-44 (1964)
102. SMITH, Q.T.: Effects of cortisone administration on
cutaneous collagen and hexosamine
in rats of various ages.
J.invest.Derm. 39, 219-224 (1962)
103. SMITH, Q.T.: Body weight, cutaneous collagen and
hexosamine of cortisone treated
female rats of various ages.
J.invest.Derm. 42, 353-357 (1964)
104. SMITH, Q.T., and D.J. ALLISON: Skin and femur
collagens and urinary hydroxyproline
of cortisone-treated rats.
Endocrinology 77, 785-791 (1965)

105. SMITH, D.A., and B.E.C. NORDIN: The relation between calcium balance and hydroxyproline excretion in osteoporosis.
Proc.Roy.Soc.Med. 57, 868-870 (1964)
106. SMITH, Q.T., J.G. RUKAVINA and E.M. HAALAND:
Urinary hydroxyproline in various diseases.
Acta Dermato-Venereol. 45, 44-49 (1965)
107. SNEDECOR, G.W.: Statistical methods, applied to experiments in agriculture and biology.
5. ad.Ames (Iowa) 1959
108. SOBEL, H., H.A. ZUTRAUEN and J.MARMORSTON:
The collagen and hexosamine contents of the skin of normal and experimentally treated rats.
Arch.Biochem. 46, 221-231 (1953)
109. STEIGLEDER, G.K., Y. KAMEI and R. KUDICKE: Die Lokalisation von proteolytischer Aktivität in entzündlich veränderter Haut.
Arch.klin.exp.Derm. 217, 307-325 (1962)
110. THER, L., H. SCHRAMM und G. VOGEL: Über die antagonistische Wirkung von Trijodthyronin und Progesteron auf den Prednisoloneffekt am Epiphysenknorpel (Prüfung der Reißfestigkeit).
Acta Endocrin. (Khb.) 42, 29-38 (1963)

111. VOGEL, G.: Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes unter dem Einfluß von Hormonen.
11. Symp.Dtsch.Gesellsch.f. Endokrinologie:
Das Cushingsyndrom.
Düsseldorf, März 1964, S. 305-310
112. VOGEL, G., und L. THER: Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Hormonen auf die physikalischen Eigenschaften von Knochen.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 47, 167-172 (1963 a)
113. VOGEL, G., und L. THER: Untersuchungen über den Einfluß endokriner Faktoren auf die Reißfestigkeit bindegewebiger Strukturen.
Arch.exp.Path.Pharmakol. 246, 72-77
(1963 b)
114. WOESSNER, J.F.: The determination of hydroxyproline in tissues and protein samples containing small proportions of this imino acid.
Arch.Biochem. 93, 440-447 (1961)
115. ZIFF, M., A. KIBRICK, C. DRESNER and H.J. GRIBETZ:
Excretion of hydroxyproline within patients with rheumatic and nonrheumatic diseases.
J.clin.Invest. 35, 579-587 (1956)

Lebenslauf

Am 14. Januar 1942 wurde ich, Rolf-Achim Schlaudecker, als Sohn des Dr.med. Rolf Schlaudecker und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Schweickert, in Bad Ems geboren. Meine Schulbildung schloß ich 1961 am Ambrosius Blahrer-Gymnasium in Gaienhofen am Bodensee mit dem Abitur ab.

Danach meldete ich mich zur Bundesmarine, von der ich im Herbst 1962 als Lt. z.S. d.R. entlassen wurde. Anschließend begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Medizinstudium. Im Herbst 1963 legte ich das Vorphysikum und im Frühjahr 1965 das Physikum ab. Abgesehen vom Wintersemester 1965/66 an den Universitätskliniken in Wien absolvierte ich die klinischen Semester an den Universitätskliniken der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Herrn Professor Dr.med. G.W. Korting,
Direktor der Universitäts-Hautklinik Mainz,
bin ich für die Arbeitsmöglichkeit an seiner
Klinik und die Unterstützung mit Sachmitteln
sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Priv.-Doz. Dr.med. H. Holzmann,
Oberarzt der Universitäts-Hautklinik Mainz,
danke ich recht herzlich für die Überlassung
des Themas sowie die wertvollen Ratschläge
und Diskussionen zu dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Chem. B. Morsches sei für die Anregungen bei der Durchführung und Abfassung
des methodischen Teils,
Herrn Priv.-Doz. Dr.med. H.J. Lange und
Herrn Dr.med. B. Friedel vom Institut für
Medizinische Statistik und Dokumentation der
Universität Mainz für die Beratung bei der
Erstellung des statistischen Teils dieser Arbeit
gedankt.

